

Die Funktion der redox-sensitiven periplasmatischen  
CSS-Domäne in der c-di-GMP-spezifischen  
Phosphodiesterase PdeC  
bei der Biofilmbildung in *Escherichia coli*

DISSERTATION

zur Erlangung des Akademischen Grades

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Susanne Herbst, geb. Barth

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Regine Hengge
2. Prof. Dr. Kürsad Turgay
3. Prof. Dr. Holger Dobbek

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.18

Diese Arbeit entstand in der Zeit zwischen September 2012 und Dezember 2016 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Regine Hengge an der Freien Universität Berlin und der Humboldt-Universität zu Berlin.

## PUBLIKATION

Sarenko, O., Klauck, G., Wilke, F. M., Pfiffer, V., Richter, A. M., **Herbst, S.**, Kaever, V. & Hengge, R. (2017). More than Enzymes That Make or Break Cyclic Di-GMP-Local Signaling in the Interactome of GGDEF/EAL Domain Proteins of *Escherichia coli*. *MBio* 8(5), e01639–17, <http://mbio.asm.org/content/8/5/e01639-17>

**Herbst, S.**, Lorkowski, M., Sarenko, O., Nguyen, T. K. L., Jaenicke, T. & Hengge, R. (2017). Transmembrane redox control and proteolysis of PdeC, a novel type of c-di-GMP phosphodiesterase. (*Embo Journal*, accepted for publication)

## DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Regine Hengge bedanken. Neben der Möglichkeit zur Bearbeitung dieses spannenden und komplexen Themas hat Prof. Dr. Hengge durch viele motivierende Gespräche und inhaltliche Diskussionen maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Für die Begutachtung dieser Arbeit gilt der Dank ebenfalls zunächst Prof. Dr. Hengge. Bedanken möchte ich mich in diesem Zusammenhang aber auch bei den weiteren Gutachtern Prof. Dr. Kürşad Turgay und Prof. Dr. Holger Dobbek. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Thomas Eitinger und Dr. Natalia Tschowri für die Mitwirkung als Kommissionsmitglieder.

Ein besonderes Dankeschön geht natürlich an die ganze AG Hengge. Während meiner Zeit in der Arbeitsgruppe sind einige Mitarbeiter gegangen und andere hinzugekommen, zudem sind wir zweimal umgezogen und doch herrschte immer ein herzliches Klima in dem die Arbeit stets Freude gemacht hat und man auch abseits davon viele Gesprächsthemen hatte.

Vom Anfang bis zum Ende meiner Promotion haben mich meine Laborkollegen Alex und Diego begleitet, vielen Dank für eure Hilfe, Kompetenz und vor allem die tolle Atmosphäre. Danke auch an Anja, Kim und Jared für das zeitweise Vergnügen ein Labor mit euch zu teilen, es war mir eine Freude. Vielen Dank an Vanessa für die kleinen Ausflüge in die Farbwelt, viel Gelächter und natürlich für das Korrekturlesen. Danke an Franzi für die lange Begleitung in diesem Abschnitt meines Lebens, der nun zu Ende geht.

Ich möchte mich außerdem bei der AG Eitinger und der AG Schneider für die mentale Hilfe und tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit mit Membranproteinen bedanken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Speziell für den Rückhalt und das Verständnis meines Mannes, ohne den vieles nicht möglich gewesen wäre.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>VII</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>X</b>
<b>Summary</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Formen bakterieller Existenz	1
1.1.1 Von der Flüssigkultur zum Biofilm	1
1.2 Der Biofilm als komplexe Lebensgemeinschaft	4
1.2.1 Arten und Entstehung von Biofilmen	4
1.2.2 Die Biofilm-Matrix	5
1.2.3 Molekulare Grundlagen physiologischer Differenzierung im <i>E. coli</i> Biofilm	9
1.3 Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP	12
1.3.1 Synthese und Abbau von c-di-GMP	14
1.3.2 Komplexität c-di-GMP abhängiger Signaltransduktion	16
1.3.3 Sensordomänen kontrollieren die Aktivität von DGCs und PDEs	19
1.4 Redoxhomöostase und Proteolyse im Periplasma	21
1.4.1 Das Disulfidbrücken(DSB)-generierende System in <i>E. coli</i>	22
1.4.2 Die Familie der HtrA-Proteasen	25
1.4.3 Thiol-basierte Redoxsensoren in Bakterien	28
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>31</b>
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>33</b>
3.1 Chemikalien und Materialien	33
3.2 Medien und Medienzusätze	34
3.2.1 Flüssigmedien	34
3.2.2 Festmedien	36
3.2.3 Medienzusätze	36
3.3 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide	37
3.3.1 Bakterienstämme	37
3.3.2 Bakteriophagen	39
3.3.3 Plasmide	40

---

<b>3.4 Mikrobiologische Methoden</b>	<b>42</b>
3.4.1 Sterilisation	42
3.4.2 Kultivierung	42
3.4.3 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	42
3.4.4 Aufbewahrung von Bakterienstämmen und Bakteriophagenlysaten	42
3.4.5 Herstellung eines P1-Lysats	43
3.4.6 P1-Transduktion	43
3.4.7 Untersuchung der Biofilmbildung auf Festmedien	43
3.4.8 Untersuchung redox-relevanter Umweltbedingungen	44
<b>3.5 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>44</b>
3.5.1 Isolation von genomischer DNA	44
3.5.2 Isolation von Plasmid DNA	45
3.5.3 Polymerasekettenreaktion	45
3.5.4 Punktspezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt-PCR	45
3.5.5 Konstruktion von Niedrigkopie-Plasmiden mit verschiedenen PdeC Derivaten	46
3.5.6 Agarosegelelektrophorese	49
3.5.7 Aufreinigung von PCR-Produkten	50
3.5.8 Restriktionsverdau	50
3.5.9 Ligation	50
3.5.10 Herstellung elektrokompenter Zellen	50
3.5.11 Elektrottransformation	51
3.5.12 TSS-Transformation	51
3.5.13 Erzeugung chromosomaler Knockout-Mutanten durch Ein-Schritt-Inaktivierung	52
3.5.14 Erzeugung chromosomaler <i>lacZ</i> -Reporterfusionen	55
<b>3.6 Biochemische Methoden</b>	<b>55</b>
3.6.1 Zellfraktionierung	55
3.6.2 $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest	56
3.6.3 Überexpression und Isolation von löslichen Proteinen	56
3.6.4 Überexpression und Isolation von Membranproteinen	58
3.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	60
3.6.6 Umpuffern von Proteinlösungen	61
3.6.7 Bestimmung der Proteinkonzentration	61
3.6.8 Erhöhung der Proteinkonzentration	61
3.6.9 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)	61
3.6.10 Immunoblotanalyse (Western-Blot)	62
3.6.11 Inkorporation von Proteinen in Nanodiscs	63
3.6.12 Enzymatischer Aktivitätsnachweis von Phosphodiesterasen	64
<b>3.7 Datenbanken und bioinformatische Analysen</b>	<b>65</b>
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>66</b>
<b>4.1 Vergleichende Analyse der CSS-Domänen PDEs aus <i>E. coli</i> K-12</b>	<b>66</b>

4.1.1	CSS-PDEs zeigen eine homologe Aminosäurestruktur mit 2 konservierten Cysteinen in der periplasmatischen Schleife	66
4.1.2	Einfluss der CSS-PDEs auf die Morphologie einer Makrokolonie	69
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung des funktionellen Mechanismus von CSS-PDEs am Beispiel von PdeC</b>	<b>72</b>
4.2.1	Einfluss plasmidkodierter PdeC-Derivate auf die Makrokoloniemorphologie	75
4.2.2	Prozessierung als Antwort auf einen veränderten Redoxstatus der konservierten Cysteine	76
4.2.3	Oxidation durch das DsbA/DsbB-System schützt PdeC vor Proteolyse	79
4.2.4	DegP und DegQ sind für die Proteolyse von reduziertem PdeC verantwortlich	81
<b>4.3</b>	<b>Beitrag der einzelnen Domänen zu Stabilität und Aktivität von PdeC</b>	<b>86</b>
4.3.1	Membranintegration durch die TM2-Domäne ist wichtig für die Aktivität von PdeC	87
4.3.2	TM1 und TM2 stabilisieren PdeC und schützen somit vor Proteolyse	89
4.3.3	Alle PdeC-Derivate bis auf die lösliche EAL-Domäne sind membrangebunden	92
<b>4.4</b>	<b>Analysen der PdeC-Derivate zur physiologischen Funktion</b>	<b>94</b>
4.4.1	PdeC zeigt <i>in vivo</i> eine redox-abhängige Repression von CsgD und Curli	94
4.4.2	Der Einfluss von DsbA und DegP/DegQ auf die Expression von CsgD und Curli	97
4.4.3	Untersuchung der enzymatischen Aktivität der PdeC-Derivate <i>in vitro</i>	99
<b>4.5</b>	<b>Redox-relevante Umweltbedingungen verändern die extrazelluläre Matrixbildung</b>	<b>103</b>
4.5.1	Reaktion auf Licht	103
4.5.1.1	Lichteinwirkung reduziert die CsgD-Expression und somit die Synthese von Matrixkomponenten	104
4.5.1.2	Lichteinwirkung erhöht die Expression von PdeC	108
4.5.2	Reaktion auf Eisenionen	110
4.5.2.1	Eisen führt zu verstärkter Produktion von Cellulose	111
4.5.2.2	PdeC <sup>ASS</sup> eliminiert die verstärkte Produktion von Cellulose durch Eisen	113
4.5.2.3	Eisenzugabe verändert nicht die Expression von PdeC	115
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>117</b>
5.1	Redox-abhängige Aktivierung von PdeC und die Rolle von DsbA/B	117
5.2	Einfluss proteolytischer Prozessierung und Dimerisierung auf die PdeC-Aktivität	123
5.3	Die Wirkung redox-relevanter Umweltbedingungen auf die Matrixsynthese und die Regulation von PdeC	127
5.4	Das Konzept der redox-abhängigen Regulation von c-di-GMP in Bakterien	132
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>136</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>138</b>
<b>8</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>161</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Physiologische Differenzierung eines Makrokolonie-Biofilms in <i>Escherichia coli</i> .....	3
Abb. 2: Der Cellulose- und Curlisyntheseapparat und dessen Wirkung auf die Morphologie einer Makrokolonie. ....	7
Abb. 3: Regulation der Matrix- und Flagellensynthese im <i>E. coli</i> Makrokolonie-Biofilm.....	10
Abb. 4: Funktion und Umsetzung des Signalmoleküls c-di-GMP.....	14
Abb. 5: Das System zur Generierung von Disulfidbrücken im Periplasma von <i>E. coli</i> .....	23
Abb. 6: Domänenstruktur und Sequenzvergleich aller CSS-Phosphodiesterasen aus <i>E. coli</i> K-12. ....	68
Abb. 7: Die veränderte Matrixkomposition in Makrokolonien führt zu charakteristischen Phänotypen. ....	69
Abb. 8: CSS-PDEs führen zu keinen signifikanten Veränderungen der Makrokoloniestruktur. ....	71
Abb. 9: Sequenzvergleich von PdeC-Homologen verschiedener Bakterienspezies. ....	74
Abb. 10: Plasmidkodierte PdeC-Derivate verändern die Matrixsynthese einer <i>E. coli</i> K-12 Makrokolonie. ....	76
Abb. 11: Die Abwesenheit der Disulfidbrücke innerhalb der CSS-Domäne führt zur Prozessierung von PdeC. ....	78
Abb. 12: Das DsbA/DsbB-System schützt PdeC durch Oxidation der CSS-Domäne vor Proteolyse.....	80
Abb. 13: Das prozessierte PdeC <sup>ASS</sup> Fragment besteht aus EAL- und 2. Transmembrandomäne. ....	82
Abb. 14: Austausch einzelner Aminosäuren N-terminal von der TM1 in PdeC <sup>ASS</sup> . ....	83
Abb. 15: DegP und DegQ sind für den Abbau von PdeC verantwortlich.. ....	84
Abb. 16: Die Proteolyse durch DegP/DegQ ist nicht essentiell für die enzymatische Aktivität der DSB-defizienten PdeC-Derivate. ....	85
Abb. 17: Aminosäuresequenz von PdeC und TM1 und TM2 von LacY.....	87
Abb. 18: Die 2. Transmembrandomäne wird für Stabilität und Aktivität von PdeC benötigt. .	88
Abb. 19: Makrokoloniemorphologie verschiedener PdeC-Varianten in pCAB18 auf Yesca-Medium im AR3110. ....	89



---

Abb. 20: TM1 und TM2 schützen PdeC vor proteolytischem Abbau. ....	91
Abb. 21: Lokalisierung aller PdeC-Derivate in Membran-assoziiierter oder löslicher Fraktion. ....	93
Abb. 22: DSB-defiziente PdeC-Varianten führen zu stark verminderten CsgD-Proteinmengen. ....	95
Abb. 23: DSB-defiziente PdeC-Varianten führen zu stark verminderter Curli-Expression. ....	96
Abb. 24: Der Effekt von DsbA und DegP/Q auf die Expression von CsgD und Curli. ....	99
Abb. 25: <i>In vitro</i> Aktivitätsanalysen von PdeC und PdeC-Derivaten. ....	101
Abb. 26: Licht reduziert die Expression Matrix-bildender Komponenten. ....	105
Abb. 27: Lichtabhängige Reduktion der Matrixsynthese in Makrokolonien. ....	107
Abb. 28: Einfluss von Licht auf die PdeC-Proteinexpression und die Makrokoloniemorphologie plasmidkodierter PdeC-Derivate. ....	109
Abb. 29: Licht erhöht die PdeC-Expression, was zu verminderten CsgD-Spiegeln führt. ....	110
Abb. 30: Der Einfluss von Eisen auf die Curli- und Cellulosesynthese. ....	113
Abb. 31: DSB-defiziente PdeC-Derivate verhindern die erhöhte Cellulosesynthese durch Eisen. ....	114
Abb. 32: Eisen hat keinen Einfluss auf die Expression von PdeC und CsgD. ....	116
Abb. 33: Modell zur Kontrolle der PDE-Aktivität von PdeC in <i>E. coli</i> über den Redoxstatus der periplasmatischen CSS-Domäne. ....	133

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemikalien, Materialien und Geräte mit Bezugsquellen .....	33
Tab. 2: Verwendete Medienzusätze, deren jeweiliges Lösungsmittel und Endkonzentrationen .....	36
Tab. 3: Liste der verwendeten Bakterienstämme .....	37
Tab. 4: Liste der verwendeten Plasmide .....	40
Tab. 5: Primer zur Klonierung in pCAB18.....	47
Tab. 6: Primer zur Herstellung von Punktmutationen.....	47
Tab. 7: Synthetische hergestellte Fragmente der Firma IDT® .....	49
Tab. 8: Primer zur Herstellung und Kontrolle chromosomaler Knockout-Mutanten .....	52
Tab. 9: Sonstige Primer .....	54
Tab. 10: Zusammenstellung der Lösungen für Sammel- und Trenngel.....	60
Tab. 11: Ansätze zur Rekonstitution von PdeC <sup>wt</sup> und PdeC TM2+EAL in Nanodiscs .....	64

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
AMP	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
A-site	<i>active site</i> (aktives Zentrum)
ATP	Adenosintriphosphat
bp; kb	Basenpaare; Kilobasenpaare
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CTD	Carboxy –terminale Domäne
dest.	destilliert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Eσ <sup>S</sup> / Eσ <sup>70</sup>	RNA-Polymerase-Holoenzym, das den σ <sup>S</sup> - bzw. σ <sup>70</sup> Faktor gebunden hat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung ( <i>gravity</i> )
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde ( <i>hour</i> )
H <sub>2</sub> O	Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
I-site	<i>inhibitory site</i> (inhibitorisches Zentrum)
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>

---

M	Molar (mol/l)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
MT	Mutante
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NTD	Amino-terminale Domäne
OD <sub>λ</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge λ
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDE	Phosphodiesterase
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
(p)ppGpp	Guanosin(penta)tetraphosphat
PVDF	Polyvenylidenfluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur bzw. reverse Transkription
s	( <i>second</i> ) Sekunde
sog.	sogenannte
sRNA	( <i>small RNA</i> ) kleine RNA
β-Gal	β-Galaktosidase
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-Buffered Saline und Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	<i>transformation and storage solution</i>

---

u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UTR	( <i>untranslated region</i> ) Nichttranslatierte Region
V	Volt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

## Zusammenfassung

Das fakultativ anaerob lebende Bakterium *Escherichia coli* K-12 besitzt 29 GGDEF- und/oder EAL-Domänenproteine, davon sind 12 Diguanylatzyklasen (DGCs), 13 Phosphodiesterasen (PDEs) und 4 degenerierte Proteine mit alternativen Funktionen. Aktive DGCs und PDEs sind maßgeblich an der Regulation des komplexen Lebensstils von *E. coli* beteiligt, indem sie die Matrixproduktion im Biofilm durch den sekundären Botenstoff c-di-GMP modulieren. Wichtige Matrixkomponenten zur Bildung und Stabilisierung eines bakteriellen Biofilms sind Curli-Fasern und Cellulose. Ihre Produktion wird durch hohe Mengen an c-di-GMP stimuliert, während geringe Mengen des sekundären Botenstoffes zur Ausbildung von Flagellen und bakterieller Motilität führen. Die Aktivität der an Abbau und Synthese beteiligten PDEs bzw. DGCs, wird durch diverse Amino-terminal gelegene Sensordomänen kontrolliert. Diese bieten die Möglichkeit der multiplen Signalintegration und Feinjustierung des c-di-GMP-Spiegels und der dadurch regulierten Matrixsynthese.

In dieser Arbeit wird die Regulation und Wirkungsweise einer neuen Klasse von Sensordomänen charakterisiert, welche gekoppelt an eine EAL-Domäne den Abbau von c-di-GMP kontrolliert. Die CSS-Domäne wird gekennzeichnet durch zwei hochkonservierte Cysteine in der periplasmatischen Schleife, von denen eines in dem namensgebenden CSS-Motiv arrangiert ist. Die Integration in die innere Membran wird durch zwei flankierende Transmembrandomänen (TM1 und TM2) gewährleistet, wobei TM2 die Verbindung zu der C-terminal gelagerten EAL-Domäne herstellt. *E. coli* K-12 besitzt 5 PDEs mit diesem signifikanten Aufbau (PdeB, PdeC, PdeD, PdeG und PdeN).

Die Analyse von PdeC, als Prototyp einer CSS-PDE, offenbarte eine enge Verbindung zum Disulfidbrücken(DSB)-System sowie wichtigen Proteasen des Periplasmas. So wird die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den konservierten Cysteinen durch das oxidierende DsbA/DsbB-System gewährleistet, was zu einer Verminderung der enzymatischen Aktivität der EAL-Domäne führt. Im Gegensatz dazu führt die reduzierte freie Thiol-Form der CSS-Domäne zu einer stark erhöhten PDE-Aktivität verbunden mit einer Dimerisierung, vermittelt durch die 2. Transmembrandomäne (Olga Sarenko und Regine Hengge, unveröffentlicht). Die Reduktion der CSS-Domäne hat jedoch zusätzlich auch eine Prozessierung durch die periplasmatischen HtrA-Proteasen DegP und DegQ zur Folge. Redundant prozessieren diese PdeC zu einem Fragment, bestehend aus TM2- und EAL-Domäne mit hoher enzymatischer Aktivität, während die EAL-Domäne allein nur geringe PDE-Aktivität besitzt und im Verlauf des Wachstums nahezu vollständig degradiert wird. Dimerisierung und Membranlokalisation sind demnach untrennbar mit der Steigerung und Aufrechterhaltung der enzymatischen Aktivität verbunden. Der Abbau auf der periplasmatischen Seite durch DegP und DegQ ist sehr effizient. Auf der cytoplasmatischen Seite hingegen erfolgt die weitere

Degradierung durch noch unbekannte Proteasen eher langsam, wodurch es unter bestimmten Bedingungen zu Akkumulierung der hochaktiven TM2+EAL-Form kommt.

Durch das Zusammenspiel von redox-abhängiger Aktivitätskontrolle und Proteolyse der c-di-GMP-spezifischen PDE PdeC wird die Produktion der amyloiden Curli-Fasern und Cellulose reguliert, welche Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix von Biofilmen sind und den Bakterien zu einer erhöhten Resistenz gegenüber diversen Umwelteinflüssen verhelfen.

## Summary

The facultative anaerobic bacterium *Escherichia coli* K-12 possesses 29 GGDEF and/or EAL domain proteins that include 12 diguanylate cyclases (DGCs) and 13 phosphodiesterases (PDEs) as well as 4 degenerate proteins with alternative functions. Enzymatically active PDEs and DGCs are involved in the regulation of the versatile lifestyle of *E. coli* by modulating biofilm matrix production via the second messenger c-di-GMP. Amyloid curli fibres and cellulose are major matrix components that form and stabilize a bacterial biofilm. In general, matrix production and biofilm formation are stimulated by high amounts of c-di-GMP, while low levels of the second messenger promote flagella rotation that is associated with motility. The enzymatic activity of c-di-GMP degrading PDEs and synthesizing DGCs is in most cases controlled by various amino-terminal sensor domains. These offer the possibility of multiple signal integration and fine tuning of the c-di-GMP level, which controls matrix synthesis.

The aim of this study was to characterize the mode of activation and physiological function of a new class of sensor domains that is coupled to an EAL domain and therefore potentially able to control c-di-GMP degradation. The CSS sensor domain contains two highly conserved cysteins in the periplasmic loop, of which one is arranged in the characteristic CSS motif. Integration into the inner membrane is ensured by two flanking transmembrane domains (TM1 and TM2), with TM2 providing a connection to the C-terminal EAL domain. *E. coli* K-12 has five PDEs with this structure (PdeB, PdeC, PdeD, PdeG and PdeN).

Analysis of PdeC as a prototype of CSS-PDEs revealed a close linkage to the disulfide bond (DSB) system as well as important periplasmic proteases. Thus, formation of a DSB between the two conserved cysteins is promoted by the oxidizing DsbA/DsbB-system and reduces enzymatic activity of the EAL domain. In contrast, the free thiol form increases PDE activity and dimerizes via the TM2 domain (Olga Sarenko and Regine Hengge, unpublished). Moreover, reduction of the CSS domain results in degradation by the periplasmic HtrA proteases DegP and DegQ. These redundantly process PdeC to a shorter fragment containing TM2 and EAL domain only, that dimerizes as well and has high PDE activity, while the EAL domain alone shows low activity and is almost completely degraded during cell growth. Thus, dimerization and membrane localization are inextricably linked to the increase and maintenance of enzymatic activity. Degradation in the periplasm mediated by DegP and DegQ is very efficient. In contrast, further proteolysis in the cytoplasm by yet unidentified proteases is rather slow, thus allowing the accumulation of the highly active TM2+EAL form. Finally, the interplay of redox dependent activity control and proteolysis of the c-di-GMP specific PDE PdeC regulates production of curli and cellulose as major matrix components of the bacterial biofilm.



# 1 Einleitung

## 1.1 Formen bakterieller Existenz

Prinzipiell unterscheidet man zwei verschiedene Formen bakteriellen Wachstums. Einerseits können Bakterien als motile Einzeller in einer flüssigen Umgebung vorkommen, andererseits sind sie in der Lage sich an Grenzflächen niederzulassen und eine Lebensgemeinschaft zu bilden, den sogenannten Biofilm (Watnick & Kolter, 2000; Davey & O'toole, 2000). Bereits sehr früh wurde erkannt, dass Bakterien ein Leben in der Gemeinschaft deutlich bevorzugen. Demnach ist die Zahl der Bakterien, welche sich in Biofilmen zusammenfinden, verglichen mit freischwimmenden Einzelzellen, deutlich höher. Das Leben in der Gemeinschaft bietet viele Vorteile und hat sich daher als ein sehr erfolgreicher Lebensstil etabliert (Costerton *et al.*, 1987; Zobell, 1943; Dunne, 2002).

In der Natur ist ein Biofilm meist das Aggregat mehrerer Bakterienspezies, die eingebettet in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) in der Lage sind die vielfältigsten Oberflächen zu besiedeln (Costerton, 1999; Watnick and Kolter, 2000; López *et al.*, 2010). Die extrazelluläre Matrix überwiegt als Hauptbestandteil des Biofilms sogar gegenüber der reinen Zellmasse und gibt dem Biofilm Struktur und Stabilität. Außerdem hilft die Matrix bei der Ausbildung von Zell-Zellkontakten und bietet Schutz vor diversen Umwelteinflüssen, Fressfeinden sowie Antibiotika (Flemming *et al.*, 2016). Für den menschlichen Organismus stellen Biofilme, insbesondere im Darm, zudem eine wichtige Barriere für pathogene Erreger dar (Jandhyala *et al.*, 2015). Hingegen führt die Biofilmbildung solcher potentiell pathogenen Erreger und die damit einhergehende erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika, Desinfektionsmitteln und dem Immunsystem immer wieder zu chronischen Infektionen und persistenten Kontaminationen (Costerton *et al.*, 1999; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Daher hat die aktuelle Forschung den Biofilm stark in den Fokus gerückt, dessen Grundlage aber nach wie vor die fundierten physiologischen Kenntnisse aus in gleichmäßig durchmischter Flüssigkultur herangezogenen Bakterien bilden.

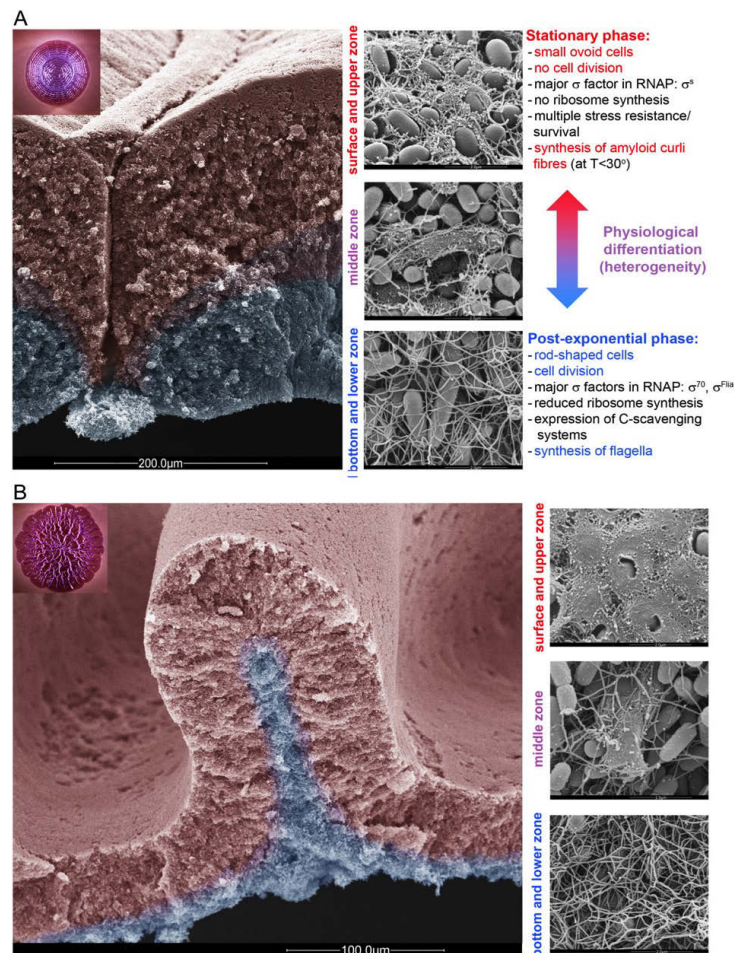
### 1.1.1 Von der Flüssigkultur zum Biofilm

Über viele Jahre wurde mit Hilfe von reichhaltigen Komplexmedien das Wachstum von Bakterien untersucht. Es stellte sich heraus, dass das Wachstum in einer flüssigen Kultur, betrachtet man Wachstumsgeschwindigkeit und Genexpressionsmuster, immer einer spezifischen Abfolge unterliegt. Nach einer kurzen Anlaufphase der sog. *lag*-Phase, teilen sich die Zellen zunächst exponentiell bis sie eine gewisse Zelldichte erreicht haben bei der die Ernährungslage nicht mehr optimal ist. Diese Zelldichte ist für jedes Bakterium und

Medium einzigartig und entspricht bei *Escherichia coli* etwa einer optischen Dichte von 0,03 bei 600 nm in *lysogeny-broth*-Medium (Sezonov *et al.*, 2007). Verknüpft das Nährstoffangebot, aufgrund der starken Zunahme von Zellen und deren Nährstoffkonsum, beginnt die post-exponentielle Wachstumsphase. Es findet eine Umstellung des Stoffwechsels statt, bei dem immer mehr Zellen in einen Hungerzustand wechseln. Um vorhandene Ressourcen optimal nutzen zu können, werden daher diverse Systeme zum Transport und zur Umsetzung von noch vorhandenen Nährstoffen aktiviert und Flagellen zur aktiven Fortbewegung ausgebildet. Dieser Zustand steht auch im Zusammenhang mit einer beginnenden Änderung der Morphologie der Zelle von eher länglich und stäbchenförmig zu klein und rund, als Folge von Teilungen ohne Zuwachs der Zellmasse. In der sich anschließenden Stationärphase wird nun auf einen Erhaltungsstoffwechsel umgestellt, in dem es zur Ausbildung von multiplen Stressresistenzen und der Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten kommt (Hengge, 2011; Kolter *et al.*, 1993). Gram-positive Bakterien wie *Bacillus subtilis* bilden in der späten stationären Wachstumsphase Sporen aus, diese sind besonders resistent gegenüber Umweltstress (McKenney *et al.*, 2013). Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* vollziehen keine Sporenbildung, die morphologischen und metabolischen Unterschiede die sich während des akuten Nährstoffmangels vollziehen, führen jedoch zu Zellen die ebenfalls sehr viel stressresistenter sind (Hengge, 2011).

Bereits vor ca. 30 Jahren wurden in *Escherichia coli* Makrokolonie-Biofilmen Zelltypen von unterschiedlicher Morphologie in verschiedenen Abschnitten des Biofilms gezeigt. (Shapiro, 1987). Aktuell untermauern diverse Studien diesen Ansatz und zeigen, dass Biofilme keineswegs eine homogene Ansammlung von Zellen sind (Depas *et al.*, 2013; Hung *et al.*, 2013; Grantcharova *et al.*, 2010). In der im Jahr 2013 erschienen Arbeit von Serra *et al.* gelang es das Wissen über die Physiologie und Morphologie von Zellen aus statisch gewachsenen Flüssigkulturen auf den Biofilm zu übertragen und somit die Heterogenität solcher Makrokolonien zu unterstreichen (Serra *et al.*, 2013b). So ergibt sich, dass die in der Flüssigkultur auftretenden Zelltypen genauso auch in dem Makrokolonie-Biofilm wiederzufinden sind, jedoch nicht ausschließlich in einer zeitlichen Abfolge, sondern ebenso in einer räumlichen. Diese räumliche Abfolge wird bestimmt durch den Abstand der Zellen von der Nährstoffquelle. Das heißt, Zellen die sich nahe der Nährstoff-enthaltenden Agarschicht befinden sind stäbchenförmig und flagelliert, demnach entsprechen sie morphologisch Zellen der post-exponentiellen Wachstumsphase in Flüssigkultur. Zellen weit entfernt vom Agar in der oberen Schicht der Kolonie sind klein, rund und eingebettet in Matrixsubstanzen und entsprechen daher morphologisch Zellen der Stationärphase. Zwischen beiden Schichten liegt eine Übergangszone, in der beide Zelltypen zu finden sind (Serra & Hengge, 2014) (Abb. 1).

Die physiologische und morphologische Differenzierung, die zu diesen unterschiedlichen Zellpopulationen innerhalb eines Biofilms führt, beinhaltet komplexe Vorgänge der Integration von äußeren Signalen in die Zelle und der daraus folgenden Umstellung des ganzen Zellmetabolismus. Solche äußeren Signale können u.a. durch Gradienten im Nährstoffgehalt, der Sauerstoffkonzentration oder des pH-Wertes bedingt sein, aber auch die Kommunikation zwischen Zellen spielt hierbei eine wichtige Rolle (Flemming *et al.*, 2016; Serra *et al.*, 2013b; Karatan & Watnick, 2009).



**Abb. 1: Physiologische Differenzierung eines Makrokolonie-Biofilms in *Escherichia coli*.** Seitliche Rasterelektronenmikroskopische (SEM) Aufnahme des Querschnitts einer 5 Tage alten, auf LB-Platte ohne Salz gewachsenen Makrokolonie des *E. coli* K-12 W3110 (A) und AR3110 (B) Stammes (links). Die mit Falschfarben kolorierten Zonen zeigen Zellen, welche sich physiologisch in der Stationärphase (rot), in der postexponentiellen Wachstumsphase (blau) oder einer Übergangszone befinden (violett). Am linken oberen Rand befindet sich jeweils die Draufsicht einer solchen Makrokolonie. Hochauflösende SEM Aufnahmen (rechts) stellen die 3 Zonen der Makrokolonie mit ihren charakteristischen Eigenschaften, wie die Einbettung kleiner runder Zellen in Curli-Fasern und Cellulose (obere Schicht  $\hat{=}$  Stationärphase) und sich teilende Zellen in einem Netz aus Flagellen (untere Schicht  $\hat{=}$  postexponentieller Wachstumsphase) sowie einer heterogenen Übergangszone dar (Serra and Hengge, 2014).

## 1.2 Der Biofilm als komplexe Lebensgemeinschaft

In der Natur sind Biofilme eine Ansammlung meist mehrerer Bakterienspezies und auch Pilzen. In dieser Lebensgemeinschaft können sich die unterschiedlichen Spezies zum Beispiel durch ausgeschiedene Stoffwechselprodukte unterstützen. Hingegen kann diese Gemeinschaft auch stark kompetitiv sein, durch die Abgabe von Toxinen oder dem Kampf um limitierte Nährstoffquellen (Dunne, 2002). Der Makrokolonie-Biofilm im Labor erwächst meist aus lediglich einer definierten Bakterienspezies, bietet dadurch aber die Möglichkeit gezielte molekularbiologische Untersuchungen anzustellen, die direkt einen Aufschluss über veränderte Komposition, Form und Entwicklung geben. Diese Modifikationen sind meist das Resultat veränderter Genexpression, die auf eine spezifische Signalintegration und Signalweiterleitung zurückgeführt werden kann und zu einem spezifischen Output führen.

### 1.2.1 Arten und Entstehung von Biofilmen

Zur Untersuchung von Biofilmen haben sich vier verschiedene Modelle etabliert, welche natürliche oder vom Menschen geschaffene Umweltbedingungen widerspiegeln sollen. Der untergetauchte Biofilm bildet eine aquatische Umgebung ab, vergleichbar mit einem Katheter im menschlichen Organismus. Die Kolonie wächst hier auf einem abiotischen festen Substrat und wird von nährstoffreicher Flüssigkeit umspült. Der subaerale Biofilm wächst auch auf einem festen Substrat, welches die Kolonie aber mit Mikronährstoffen versorgt und an eine gasförmige Phase grenzt, was zum Beispiel dem Wachstum auf Felsen oder Wänden entspricht. Die gasförmige Phase enthält Sauerstoff und gebundenes Wasser und ist ebenfalls eine Grenzfläche im Makrokolonie-Biofilm. Dieser wächst jedoch auf einem reichhaltigen, gallertartigen Medium heran, wie es Nahrungsmittel oder auch Organe sein können. Das letzte Modell, der Pellikel bildet sich an Grenzflächen zwischen gasförmiger und nährstoffreicher flüssiger Phase wie in Gewässern vorzufinden (Serra & Hengge, 2014). Unter Laborbedingungen können diese Modelle unter kontrollierten Bedingungen nachgestellt und genau erforscht werden.

Die Entstehung eines Biofilms beginnt zunächst mit dem reversiblen Anheften einer planktonischen Bakterienzelle oder eines Zellverbunds an eine biotische oder abiotische Oberfläche. Die Überwindung von elektrostatischen und hydrodynamischen Kräften vor dem primären Adhäsionsprozess wird durch die aktive Fortbewegung mit Flagellen gewährleistet. Danach wird ein erfolgreicher Adhäsionsprozess von diversen Variablen wie hydrophoben Wechselwirkungen, van der Waals Kräften oder schlicht durch sterische Hindernisse entschieden. Stellen sich die Oberflächeneigenschaften als geeignet dar, beginnt die irreversible Anheftung durch die Sekretion von Adhäsinen wie Curli-Fasern, konjugativen Pili

oder Typ 1 Fasern (Costerton *et al.*, 1999; Beloin *et al.*, 2008; Dunne, 2002). Die Reifung zu einem komplexen dreidimensionalen Gebilde wird durch entstehende Zell-Zell-Kontakte, Kommunikation mit sog. Quorum Sensing Molekülen und die Ausbildung extrazellulärer Matrixsubstanzen vermittelt (Martinez & Vadyvaloo, 2014; López *et al.*, 2010; Camilli & Bassler, 2006). Lösen sich Zellen oder auch Zellaggregate wieder aus diesem Verbund, spricht man von Dispersion. Dispersion kann sowohl interne als auch externe Ursachen haben und gibt den Bakterien die Möglichkeit, sollten sich die vorherrschenden Umweltbedingungen verschlechtert haben, neue Umgebungen aufzusuchen und zu besiedeln (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

### 1.2.2 Die Biofilm-Matrix

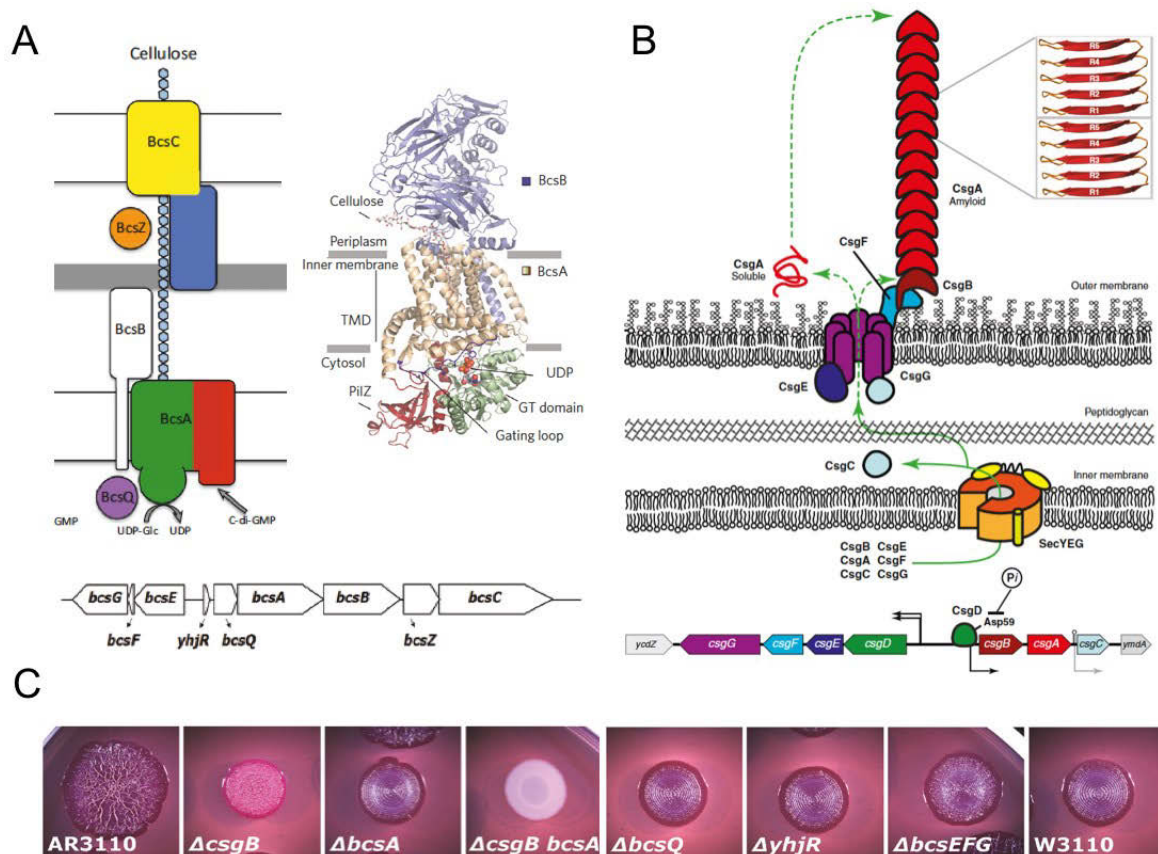
Bei der Bildung eines Biofilms, aus zuvor planktonisch lebenden Zellen, ist die Sekretion extrazellulärer Matrixkomponenten essentiell und determiniert Form und Eigenschaften der Kolonie. Ein Großteil der Biofilmmatrix ist Wasser, welches in Exopolysacchariden gebunden wird und wichtig für alle Diffusionsprozesse ist (Sutherland, 2001). Die Biofilm-Matrix beinhaltet neben den Exopolysacchariden auch sekretierte Proteine, durch Zellyse freigesetzte Nukleinsäuren, Lipide sowie andere Polymere und Metabolite. Extrazelluläre Strukturen wie Flagellen, Pili und Curli-Fasern tragen außerdem zur Stabilität des Biofilms bei (Flemming & Wingender, 2010).

In der initialen Phase der Biofilmbildung bei *Escherichia coli* sorgen Autotransporter wie z. B. Ag43 als Adhäsine für die Anheftung der Zellen aneinander, wodurch sich die ersten kleinen Aggregate bilden. Im reifen Biofilm sind die konservierten Hauptkomponenten der Matrix Curli-Fasern, Flagellen und Cellulose, diese tragen maßgeblich zur komplexen Architektur eines Makrokolonie-Biofilms bei und sollen im Folgenden näher erläutert werden (Hobley *et al.*, 2015). Flagellen verleihen dem Bakterium die Fähigkeit sich aktiv fortzubewegen, aber auch in Biofilmen spielen sie eine wichtige Rolle. In einem *E. coli* Makrokolonie-Biofilm befinden sie sich an Zellen, die direkt am nährstoffgebenden Agar lokalisiert sind und formen dort ein dichtes Netz. Mutationen von *fliC*, welches die Flagellumuntereinheit kodiert und *motA*, einem für die Motorproteine zur Flagellenrotation kodierenden Gene, resultieren in einer geringer ausgebildeten Biofilmstruktur. Im Fall von MotA führt der Verlust der Fähigkeit zur Flagellenrotation dazu, dass die Flagellen weniger ineinander verhakt sind und sich somit ein instabileres Netz um die Zellen bildet (Serra *et al.*, 2013b).

Curli-Fasern sind funktionale Amyloide geordnet aggregierter Proteine. Diese Form von Proteinen weist eine hohe Resistenz gegenüber Proteasen und Denaturierung auf, außerdem sind sie mit schweren Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson assoziiert (Marshall & Serpell, 2009; Epstein & Chapman, 2008; Blanco *et al.*, 2012). Viele

Enterobakterien wie *E. coli* und *Salmonella spp.* produzieren Curli-Fasern mit denen sie an Oberflächen adhären, aggregieren und Biofilme ausbilden können. Im Zuge dessen spielen sie bei pathogenen Erregern auch eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Invasion der Wirtszelle und induzieren deren Entzündungsantwort (Chapman *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 1998; Römling *et al.*, 1998; Barnhart & Chapman, 2006; Kikuchi *et al.*, 2005). Die Assemblierung der Curli-Fasern wird von den Genprodukten zweier divergent transkribierter Operon-Einheiten vermittelt (Abb. 2 B). Das *csgDEFG*-Operon kodiert, neben der notwendigen Exportmaschinerie für den Masterregulator der Curli-Biogenese CsgD („*c*urlin *s*ubunit *g*ene *D*“). Als Transkriptionsaktivator ist CsgD für die Expression des *csgBAC*-Operons notwendig, welches die strukturellen Curli-Untereinheiten kodiert. Die intergenische Region zwischen beiden Operon-Einheiten ist eine der größten in *E. coli*, somit kann die Expression durch diverse Faktoren vielfältig und präzise reguliert werden (Blanco *et al.*, 2012; Epstein & Chapman, 2008; Wang *et al.*, 2007). In den meisten *E. coli* und *Salmonella* Laborstämmen erfolgt die Expression in Abhängigkeit von Wachstumsphase und Temperatur, sodass es nur zu einer Ausbildung von Curli-Fasern bei Temperaturen unter 30°C und dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase kommt. Es wurden jedoch auch klinische sowie kommensale Stämme isoliert, die Curli-Fasern bei 37°C exprimieren und somit beispielsweise besser an Wirtszellen adhären. Zusätzlich zu diesen Variablen, können auch andere Umweltsignale wie Nährstofflimitation, Osmolarität oder Sauerstoffgehalt die Curli-Synthese beeinflussen (Bian *et al.*, 2000; Barnhart & Chapman, 2006).

Polysaccharide bilden einen weiteren wichtigen Baustein im Biofilm und werden von den Bakterien selbst aktiv produziert und sekretiert. Diese Polymere aus Zuckermolekülen können sehr vielfältig innerhalb und zwischen Bakterienspezies sein und tragen u. a. zur Entstehung von Zell-Zell-Kontakten bei (Beloïn *et al.*, 2008; Sutherland, 2001). In *Escherichia coli* wurden drei verschiedene Exopolysaccharide identifiziert, die für den Biofilm eine wichtige Bedeutung haben. Das sind Poly-β-1,6-N-Acetyl-D-glucosamine (PGA), Cellulose und Kolansäure (Beloïn *et al.*, 2008). Kolansäure führt unter widrigen Umweltbedingungen zur Bildung einer schützenden Kapsel und benötigt die Expression von 19 Genen die alle im *wca* Gencluster zusammengefasst sind. Im Kontext der Biofilmbildung wurde gezeigt, dass Mutanten die keine Kolansäure mehr bilden können wesentlich dünnere und weniger komplexe Biofilme ausbilden (Beloïn *et al.*, 2008; Karatan & Watnick, 2009).



**Abb. 2: Der Cellulose- und Curlisyntheseapparat und dessen Wirkung auf die Morphologie einer Makrokolonie. A)** Schematische Darstellung des Cellulosesekretionssystems in der Membran (links). Die Synthese von Cellulose aus UDP-Glukose-Einheiten und der Transport durch die Membran erfolgt über BcsA, der Export durch die äußere Membran über BcsC. Grün: GT-Domäne; Rot: PilZ-Domäne; Blau: Tetra-Trico-Peptid-Domäne; Gelb: OM-Porin; Orange: Endoglucanase; Violett: MinD-Homolog; Weiß: Funktion unbekannt (aus Whitney & Howell, 2013). Die Röntgenkristallstruktur von BcsA (Beige: TM-Domäne; Rot: PilZ-Domäne; Grün: GT-Domäne) und BcsB (Violett) in der inneren Membran von *R. sphaeroides* (rechts) (aus Krasteva & Sondermann, 2017). Die Operonstruktur der *bcs* Region in *E. coli* K-12 (aus Serra *et al.*, 2013a). **B)** Schematische Darstellung der Curli-Biogenese. Durch das Sec-Transportsystem gelangen die Csg-Proteine in das Periplasma. Das Lipoprotein CsgG bildet eine Pore in der äußeren Membran durch diese gelangen CsgA und CsgB, abhängig von CsgE und CsgG, an die Zelloberfläche. CsgF stellt die Verbindung von CsgB mit der äußeren Membran her. CsgB sorgt als Nucleatorprotein für die geordnete Assemblierung der CsgA Untereinheiten zu einer amyloiden Curli-Faser (aus Blanco *et al.*, 2012). **C)** Koloniemorphologie des Curli- und Cellulose-produzierenden AR3110 Stammes sowie verschiedene Mutanten von Komponenten, welche an Curli- und Cellulosesynthese beteiligt sind (aus Serra *et al.*, 2013a).

Cellulose ist eine weitere wichtige Komponente in der Biofilm-Matrix vieler Bakterien. Das Polymer aus  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosemolekülen ist trotz seiner Einfachheit hochstabil und widersteht Säuren, starker Hitze oder Verformung (Römling, 2007). Durch diese chemischen Eigenschaften trägt Cellulose zu einer erhöhten Toleranz gegenüber diversen Umwelteinflüssen bei. Gemeinsam mit den Curli-Fasern schützt es *E. coli* Biofilme sogar vor Fraßfeinden wie dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Hobley *et al.*, 2015; Hufnagel *et al.*, 2014). Cellulose als Komponente der Biofilm-Matrix wurde zunächst in *Salmonella typhimurium* entdeckt. Dort wurden auch die zwei divergent transkribierten



Operon-Einheiten *yhjR-bcsQABZC* und *bcsEFG* beschrieben, welche an der Cellulosesynthese beteiligt sind (Abb. 2 A) (Zogaj *et al.*, 2001; Hobley *et al.*, 2015). Diese Gene sind hochkonserviert und kommen in vielen Enterobakterien, so auch *Escherichia coli* und *Shigella spp.* vor (Beloin *et al.*, 2008). Sie führen jedoch nicht immer auch zur Synthese von Cellulose, wie der weit verbreitete Laborstamm K-12 des gram-negativen Enterobakteriums *Escherichia coli* zeigt. Dieser Stamm kodiert zwar alle für die Synthese nötigen Komponenten, Cellulose wird aber trotzdem nicht ausgebildet. Schon minimale Genmutationen können zum Verlust dieser Maschinerie führen, wie die Arbeit von Serra *et al.* zeigt. Demnach mutierte im Zuge der Domestizierung im Labor, direkt am Anfang des *bcsQ* Leserasters, das Nucleotid Thymin zu Adenin was die Insertion eines Stopcodons an dieser Stelle zur Folge hatte. Da *bcsQ* sich am Anfang des *yhjR-bcsQABZC*-Operons befindet, wirkt sich diese Mutation auch negativ auf die Expression nachfolgender struktureller Gene aus. Der Austausch des Nucleotids an dieser Stelle führte zu einer vollständigen Regeneration der Cellulosesynthese im *E. coli* K-12 Laborstamm, der auch Grundlage dieser Arbeit ist (Serra *et al.*, 2013a).

In *E. coli* ist der Celluloseapparat an den Zellpolen lokalisiert. BcsQ ist als ATPase der MinD-Familie in diesem Zusammenhang sehr wahrscheinlich für diese Lokalisation verantwortlich (Le Quéré & Ghigo, 2009). Die folgenden Genprodukte BcsA und BcsB bilden die beiden Untereinheiten des membranständigen Cellulosesynthese-Komplexes und sind *in vitro* ausreichend für die Herstellung eines Cellulosestranges, indem sie UDP-Glukose zu Cellulose verknüpfen (Abb. 2 A) (Hobley *et al.*, 2015; Omadjela *et al.*, 2013). Für eine maximale Ausbeute an Cellulose in der Zelle wird zusätzlich das Genprodukt von *bcsC* benötigt. Die genaue Funktion dieses periplasmatischen Proteins ist noch nicht vollständig geklärt. Die starke strukturelle Ähnlichkeit zu den in *P. aeruginosa* vorkommenden AlgK-AlgE-Proteinen aus dem Alginate-Synthese-Komplex legt jedoch nahe, dass BcsC ein Porin in der äußeren Membran bildet und somit den Transport von Cellulose aus der Zelle gewährleistet (Whitney & Howell, 2013; Römling & Galperin, 2015). Bei BcsZ handelt es sich um ein extracytoplasmatisch lokalisiertes Protein mit Cellulase-Aktivität, welches womöglich eine wichtige Rolle beim korrekten Aufbau des neu synthetisierten Cellulosestranges übernimmt (Nakai *et al.*, 2013). Die Deletion des *yhjR*-Gens führt in dem Cellulose-positiven *E. coli* K-12 Stamm zum phänotypischen Verlust von Cellulose (Abb. 2 C). Die Funktion dieses Proteins im Zusammenhang mit der Cellulosesynthese ist aber noch völlig unklar. Bei der Deletion des divergent liegenden *bcsEFG*-Operons zeigt sich dieser Verlust ebenfalls, auch hier ist Funktion und Wirkungsweise aber noch wenig erforscht (Serra *et al.*, 2013a; Zogaj *et al.*, 2001).

Die Expression von Cellulose in *E. coli* erfolgt wie bei den Curli-Fasern Stationärphasen-abhängig, allerdings über eine indirekte Aktivierung durch CsgD (siehe Abschnitt 1.2.3).



Somit sind beide Elemente der extrazellulären Matrix eng miteinander verknüpft und führen in *E. coli* und *S. enterica* zu der Ausbildung des charakteristischen rdar(„red, dry und rough“)-Phänotyps (Romling, 2005). Makrokolonien dieser Stämme, die mehrere Tage auf einer nährstoffreichen Agaroberfläche wachsen, entwickeln eine komplexe 3D-Struktur mit sich auffaltenden radialen Stegen und feinen Fältchen in einer sonst sehr flachen und räumlich weit ausgedehnten Kolonie mit trockener und rauer Oberfläche. Die rote Farbe resultiert aus der Verwendung des Indikatorfarbstoffes Kongorot (KR) im Medium, welcher beim Nachweis extrazellulärer Substanzen Verwendung findet. Der Farbstoff bindet an extrazelluläre Proteine und Polysacharide und führt zu einer typisch dunkelvioletten bis dunkelroten Koloniefarbe (Romling, 2005; Serra *et al.*, 2013a). Im Gegensatz dazu bildet eine Makrokolonie, die ausschließlich Curli-Fasern produziert, ein konzentrisches Ringmuster. Stämme, die nur Cellulose produzieren, zeigen ein fein verzweigtes Netz aus kleinen Fältchen. Das Fehlen beider Matrixsubstanzen führt zu einer glatten Kolonie, die kein Kongorot mehr binden kann und daher weiß erscheint. Große, flache Kolonien mit nur noch wenig, sich aber sehr hoch auftürmenden Stegen entstehen bei der Überproduktion von Curli und Cellulose. Diese bestimmen somit maßgeblich die 3-dimensionale Struktur von Makrokolonie-Biofilmen. Während die konzentrischen Ringe durch Brüche in der Oberfläche entstehen, die durch den Druck darunterliegender sich teilender Zellen hervorgerufen werden, sind Kolonien mit beiden Matrixsubstanzen viel elastischer und brechen nicht, sondern türmen sich zu hohen Falten auf.

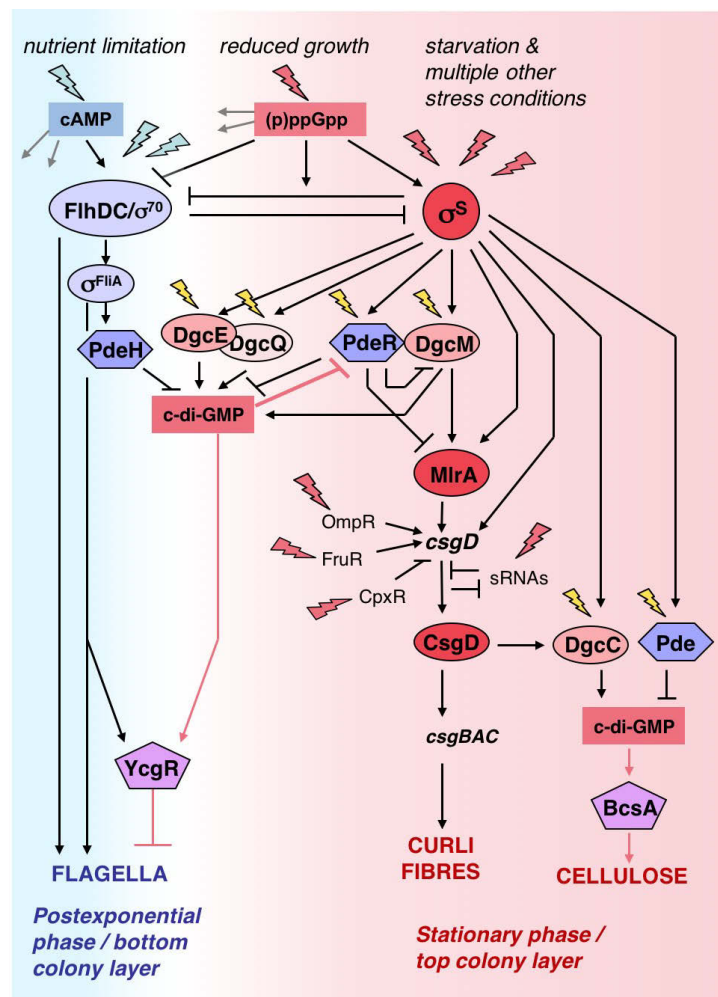
Es hat sich gezeigt, dass das Zusammenspiel und Vorhandensein verschiedener Matrixkomponenten wie Cellulose und Curli-Fasern eine enorme Wirkung auf die Morphologie einer Makrokolonie hat (Serra *et al.*, 2013a). So kann diese auch Hinweise auf Veränderungen im Genexpressionsmuster geben, die dazu führen, dass bestimmte Komponenten der Matrix vermehrt oder vermindert synthetisiert werden, was zu entsprechend veränderten Phänotypen führt (Serra *et al.*, 2015).

### 1.2.3 Molekulare Grundlagen physiologischer Differenzierung im *E. coli*

#### Biofilm

Zellen in einem Biofilm sind, je nach Lage in diesem, unterschiedlichen Wachstumsbedingungen wie Nährstoff- oder Sauerstoffgradienten ausgesetzt. Diese Gradienten haben einen großen Einfluss auf die Genexpression der unterschiedlich lokalisierten Zellpopulationen und determinieren damit die Physiologie des Makrokolonie-Biofilms. Die grundlegenden Regulationsmechanismen der Nährstoff-abhängigen generellen Stressantwort in *Escherichia coli*, bestimmen daher die physiologische Differenzierung innerhalb der Makrokolonie (Serra *et al.*, 2015). Diese Mechanismen sind essentiell bei der

Entscheidung über die Lebensstrategie der Zellen, zu wachsen und sich zu vermehren oder schlicht zu überleben. Abbildung 2 zeigt das regulatorische Netzwerk zweier invers regulierter Signalkaskaden, die einerseits in der postexponentiellen Wachstumsphase zur Ausbildung von Flagellen und einem motilen Zellstadium in Flüssigkultur führen (Abb. 3: blau hinterlegt) und andererseits in der stationären Wachstumsphase die Produktion von Cellulose und Curli-Fasern aktivieren (Abb. 3: rot hinterlegt). Die grundlegenden Komponenten dieses regulatorischen Netzwerks bilden verschiedene Sigmafaktoren, Transkriptionsfaktoren und sekundäre Botenstoffe (Serra & Hengge, 2014).



**Abb. 3: Regulation der Matrix- und Flagellensynthese im *E. coli* Makrokolonie-Biofilm.** In *E. coli* werden Flagellensynthese und Matrixproduktion invers durch zwei Signalkaskaden mit unterschiedlichen Hierarchie-Stufen kontrolliert. An oberster Stelle wird durch Sigmafaktorkompetition eine globale Veränderung der Genexpression unter den jeweiligen Bedingungen geschaffen. Abhängig davon, tragen auf den unteren Ebenen Transkriptionsregulatoren und der sekundäre Botenstoff c-di-GMP zur nährstoffabhängigen Zelldifferenzierung bei. PdeH, DgcE und DgcQ sind an der Umsetzung von c-di-GMP beteiligt und kontrollieren damit die Motilität über YcgR sowie die Expression von csgD durch den PdeR-DgcM-MlrA-Komplex. CsgD aktiviert die Curli-Synthese und über das lokal wirkende c-di-GMP Modul DgcC-PdeK die Celluloseproduktion. Während in Flüssigmedium kultivierte Zellen diese Kaskaden zeitlich getrennt durchlaufen, finden sie in Makrokolonien durch räumliche Separierung mit unterschiedlichen Nährstoffbedingungen zeitgleich statt (Serra and Hengge, 2014).

Sigmafaktoren kompetieren in der Zelle um eine limitierte Anzahl von RNA-Polymerase(RNAP)-Kernenzym und aktivieren durch die Erkennung von spezifischen Promotorsequenzen bestimmte Gruppen von Zielgenen (Grigorova *et al.*, 2006; Ishihama, 1993). In wachsenden Zellen bindet vermehrt der vegetative Sigmafaktor  $\sigma^{70}$  (RpoD) an das RNAP-Kernenzym und stabilisiert den Grundstoffwechsel der Zelle. Demgegenüber steht  $\sigma^S$  (RpoS), der in der stationären Phase des Zellwachstums zur Umstellung der Genexpression hin zu einem Erhaltungsstoffwechsel führt (Weber *et al.*, 2005). Zu diesen beiden sehr global wirkenden Sigmafaktoren kommen in *E. coli* noch fünf weitere alternative Sigmafaktoren, die nur unter bestimmten Bedingungen an die RNAP binden. Bei einem Mangel an Stickstoffverbindungen wird  $\sigma^N$  (RpoN) aktiv und an der Hitzeschockantwort ist  $\sigma^H$  (RpoH) beteiligt,  $\sigma^F$  (FliA) führt zur Expression von Genen die für die Flagellen-Synthese nötig sind, während  $\sigma^{feci}$  (FecI) die Eisenaufnahme reguliert und unter periplasmatischen Stressbedingungen wiederum  $\sigma^E$  (RpoE) vermehrt an die RNAP bindet (Yura & Nakahigashi, 1999; Angerer *et al.*, 1995; Lonetto *et al.*, 1994; Arnosti & Chamberlin, 1989; Kustu *et al.*, 1989; Hengge, 2011). Die Konkurrenz von  $\sigma^{70}$  und  $\sigma^S$  führt je nachdem welcher Sigmafaktor die Oberhand über das limitierte RNAP-Kernenzym gewinnt zur Aktivierung einer spezifischen Signalkaskade, die daraufhin zur Ausbildung von Flagellen in sich teilenden Zellen führt oder zur Produktion von Curli-Fasern und Cellulose in Zellen der stationären Wachstumsphase (Pesavento *et al.*, 2008). An dieser regulatorischen Signalkaskade sind Transkriptionsfaktoren als Masterregulatoren beteiligt, welche ihrerseits auf bestimmte sekundäre Botenstoffe reagieren (Serra & Hengge, 2014).

Transkriptionsfaktoren binden meist als Dimere oder Multimere an die DNA und können auf die Transkription bestimmter Gene oder Gencluster einen aktivierenden oder reprimierenden Effekt haben. Dieser Effekt ergibt sich aus der sterischen Einflussnahme des Transkriptionsfaktors auf den Promotorbereich der DNA, an den er bindet und dadurch mit der RNAP konkurriert oder dessen Bindung stabilisiert. Transkriptionsfaktoren, die meist aus einer Sensordomäne und einer DNA-bindenden Helix-turn-Helix Domäne bestehen, können Umweltsignale wahrnehmen und die Aktivität des Promotors an diese anpassen (Browning & Busby, 2016). Die Wirkungsweise von Transkriptionsfaktoren kann positiv durch die Bindung von Liganden beeinflusst werden, wie bei dem zur Nutzbarmachung alternativer Kohlenstoffquellen aktivierten Transkriptionsregulator CRP (cAMP-Rezeptor-Protein) (Soutourina *et al.*, 1999; Botsford & Harman, 1992). CRP aktiviert außerdem das Klasse 1 Operon der flagellaren Kaskade *flhDC*. Der darin kodierte Transkriptionsfaktorkomplex FlhDC stößt die Expression vieler weiterer Gene und somit regulatorischer Prozesse an, die in ihrer Summe zu der Ausbildung funktionsfähiger Flagellen führen (Wang *et al.*, 2006; Chevance and Hughes, 2008). Dieser regulatorischen Kaskade zur Aktivierung von Genen der postexponentiellen Wachstumsphase, wie sie auch in der unteren Schicht eines

Makrokolonie-Biofilms zu finden ist, steht ein ebenso hierarchisch komplex aufgebauter Signaltransduktionsweg gegenüber, an dessen Spitze sich der Sigmafaktor der generellen Stressantwort  $\sigma^S$  befindet (Abb. 3).

Beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase wird, wenn sich die Nährstoffbedingungen verschlechtern,  $\sigma^S$  stabilisiert und FlhDC sowie  $\sigma^F$  nicht mehr exprimiert und degradiert (Pesavento & Hengge, 2012; Barembruch & Hengge, 2007). Dies geschieht in der Übergangszone der Makrokolonie und zeigt sich durch die zunehmende Ausdünnung der Flagellen und einer kleiner und runder werdenden Zellmorphologie als Konsequenz fortschreitende Zellteilung ohne Wachstum (Serra *et al.*, 2013b; Hengge, 2011). Somit bindet in dieser Phase  $\sigma^S$  verstärkt an die RNAP und es kommt zur Umstellung des gesamten globalen Genexpressionsmusters. Damit verbunden ist die Expression zweier weiterer wichtiger Transkriptionsfaktoren, MlrA und CsgD. Der MerR-ähnliche Transkriptionsfaktor MlrA aktiviert durch einen komplexen Mechanismus die Transkription von *csgD* (siehe Abschnitt 1.3.2) (Lindenberg *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2001; Ogasawara *et al.*, 2010). CsgD gehört zu der Familie der LuxR-ähnlichen Transkriptionsfaktoren und ist der zentrale Masterregulator für die Ausbildung der extrazellulären Matrixkomponenten Curli und Cellulose. Aus diesem Grund ist er Ziel diverser Signalintegration sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene. Transkriptionsfaktoren wie OmpR oder CpxR geben beispielsweise Veränderungen in der Osmolarität oder Nährstofflage weiter und modulieren damit die Transkription von *csgD* (Gerstel *et al.*, 2006; Jubelin *et al.*, 2005; Prigent-Combaret *et al.*, 2001). Zusätzlich kann die Translation und der Abbau der *csgD* mRNA durch verschiedene kleine regulatorische RNAs (sRNAs) beeinflusst werden (Mika & Hengge, 2014).

Eine weitere, maßgeblich an der physiologischen Differenzierung beteiligte Komponente, ist der sekundäre Botenstoff c-di-GMP. Dieser spielt zudem eine zentrale Rolle in den Untersuchungen dieser Arbeit und soll im folgenden Kapitel daher eingehender beschrieben werden.

### 1.3 Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP

Sekundäre Botenstoffe kommen in fast allen Bakterienspezies vor, ohne sie wäre ein so komplexes und variables Netzwerk der Signalverarbeitung nicht möglich. Die Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen erfordert u. a. die Modulation von Proteinkomplexen, welche das Verhalten der Zelle steuern. Diese Komplexe sind meist große Makromoleküle und benötigen bei der *de novo* Synthese viel Zeit und Energie, daher ist die Übertragung von Signalen aus der Umwelt durch kleine energieärmere Moleküle essentiell, um schnell und effizient auf äußere Reize reagieren zu können (Mills *et al.*, 2011).

Bei der Bildung eines Biofilms und der Entwicklung der beiden Schichten sind in Abhängigkeit des physiologischen Zustands der Zelle drei sekundäre Botenstoffe von Bedeutung. cAMP wird durch Adenylatcyclasen synthetisiert und akkumuliert in der Zelle, wenn es zu einem Mangel an Glukose als primärer Kohlenstoffquelle kommt (Hengge *et al.*, 2015b; Soutourina *et al.*, 1999; Botsford & Harman, 1992). Geringe Wachstumsraten, hervorgerufen durch Aminosäuremangel beim Eintritt in die Stationärphase, führen zu vermehrter Synthese von (p)ppGpp, eines weiteren sekundären Botenstoffes. Die dadurch ausgelöste „stringent response“ sorgt für eine globale Umstellung des zellulären Stoffwechsels, die die Wiederherstellung des Gleichgewichtes von Proteinproduktion und Proteinbedarf bewirkt (Liu *et al.*, 2015; Agirrezabala *et al.*, 2013; Srivatsan & Wang, 2008).

Der ubiquitär vorkommende sekundäre Botenstoff c-di-GMP ist bereits seit 30 Jahren bekannt und im Vergleich sehr gut erforscht. Er koordiniert diverse Prozesse, die im Zusammenhang mit Motilität, Virulenz, Zellzyklussteuerung und Biofilmbildung stehen (Jenal *et al.*, 2017). Besonders die Stimulation von Matrixsubstanzen bei der Biofilmbildung und die inhibierende Wirkung auf die Motilität machen c-di-GMP zu dem zentralen Molekül beim Umschalten zwischen diesen beiden „Lebensstilen“ (Hengge, 2010). C-di-GMP koordiniert auf mehreren Ebenen der Expression die Anpassung des Bakteriums an sich verändernde Umweltbedingungen und bietet der Zelle daher die Möglichkeit gleichzeitig das Signal verschiedener Prozesse in den Stoffwechsel zu integrieren oder durch bestimmte lokal wirkende c-di-GMP Module zu entkoppeln (Sarenko *et al.*, 2017; Jenal *et al.*, 2017).

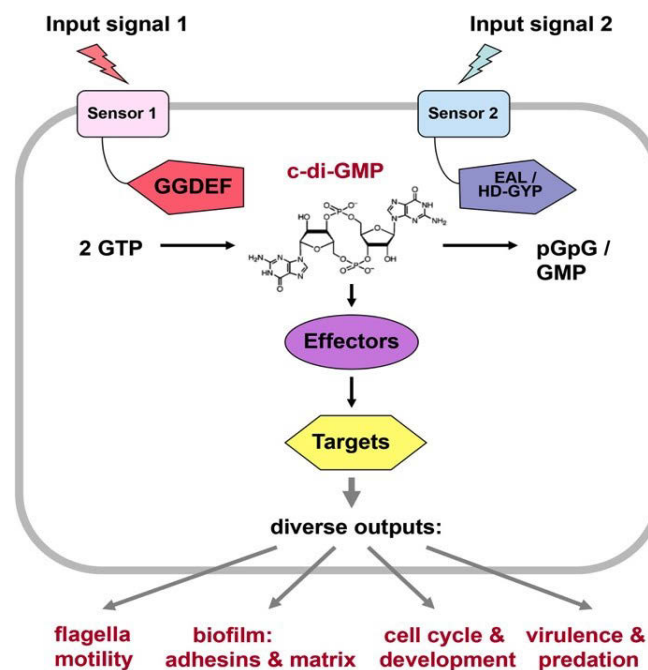
Prinzipiell haben hohe Spiegel an zellulärem c-di-GMP eine stimulierende Wirkung auf die Produktion der extrazellulären Polysaccharide PNAG und Cellulose in *E. coli* sowie Alginat und Pel in *Pseudomonas aeruginosa* (Liang, 2015). Auch amyloide Strukturen wie Curli-Fasern sind abhängig von einem hohen c-di-GMP Spiegel (Römling *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2006). Hingegen führen geringe Mengen an zellulärem c-di-GMP zur Aktivierung mit Motilität verknüpfter Komponenten wie Flagellen und Pili (Pesavento *et al.*, 2008; Guttenplan & Kearns, 2013; Römling *et al.*, 2013). Weitere Studien zeigen, dass die akute Virulenz ebenfalls mit niedrigen Mengen an c-di-GMP verbunden ist. Chronische Infektionen erfordern einen hohen Spiegel zur Ausbildung resistenter und dormanter Zellstadien, die unter günstigen Bedingungen wieder reaktiviert werden können (Römling *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2006). Zudem wurde gezeigt, dass auch bei der Synthese von Antibiotika in *Streptomyces spp.* oder Siderophoren in *Pseudomonas aeruginosa* auf diesen Botenstoff zurückgegriffen wird (Tschowri, 2016; Malone *et al.*, 2010).

Enzyme, die am c-di-GMP Metabolismus beteiligt sind, kommen ubiquitär in Bakterien vor. Interessant ist hierbei, dass freilebende Spezies mit komplexem Lebensstil weitaus mehr c-di-GMP-metabolisierende Enzyme besitzen als obligat lebende Parasiten. Neben Bakterien befinden sich diese Enzyme auch in niedrigen Eukaryoten wie der Amöbe *Dictyostelium*, bei

welcher ebenfalls der Wechsel von zwei Lebensstilen, nämlich der einer motilen Amöbe zu einer sessilen Stämmchen-Zelle, durch das Signalmolekül induziert wird (Schaap, 2013; Römling *et al.*, 2013). Die Menge an c-di-GMP-metabolisierenden Enzymen schwankt enorm zwischen den einzelnen Bakterienspezies, so findet man bei *Haemophilus influenza* keine, in *S. coelicolor* lediglich 7 und bei *P. aeruginosa* ganze 39 solcher Gene, welche für Proteine zur Synthese und zum Abbau kodieren (Liang, 2015). *Escherichia coli* K-12 kodiert für 29 dieser Proteine und befindet sich damit im oberen Feld, was ein komplexes Regulationsnetzwerk erahnen lässt und im Weiteren genauer betrachtet werden soll.

### 1.3.1 Synthese und Abbau von c-di-GMP

Der zelluläre c-di-GMP-Spiegel wird als Antwort auf externe Stimuli reguliert. Diese Regulation wird durch die Aktivität von zwei hochkonservierten und antagonistisch wirkenden Proteinfamilien gesteuert (Abb. 4) (Jenal *et al.*, 2017; Liang, 2015; Hengge *et al.*, 2015b; Römling *et al.*, 2013; Krasteva *et al.*, 2012): Diguanylatzyklasen (DGCs) und c-di-GMP spezifische Phosphodiesterasen (PDEs).



**Abb. 4: Funktion und Umsetzung des Signalmoleküls c-di-GMP.** Synthese und Abbau von c-di-GMP erfolgt durch Diguanylatzyklasen mit GGDEF-Domänen bzw. Phosphodiesterasen mit EAL- oder HD-GYP-Domänen. C-di-GMP-bindende Effektorproteine („Effectors“) interagieren mit diversen Zielmolekülen („Targets“) oder -strukturen und generieren eine spezifische Antwort. Die Aktivität der PDEs und DGCs wird häufig über N-terminale Sensordomänen kontrolliert, die sowohl im Cytoplasma als auch im Periplasma lokalisiert sein können. Generell wirkt sich ein hoher c-di-GMP-Spiegel positiv auf die Bildung extrazellulärer Matrixkomponenten aus, während die Motilität negativ beeinflusst wird (aus Hengge *et al.*, 2015b).

Diguanylatzyklen besitzen in ihrem katalytisch aktiven Zentrum (A-site) ein konserviertes GGDEF(Gly-Gly-Asp-Glu-Phe)- oder GGEEF(Gly-Gly-Glu-Glu-Phe)-Motiv, wobei nahezu jeder Aminosäureaustausch zu einem Funktionsverlust der DGC führt (Malone *et al.*, 2007; Ryjenkov *et al.*, 2005). Zusätzlich besitzen einige DGCs eine sog. inhibitorische Zentrum (I-site), charakterisiert durch ein RxxD(Arg-xx-Asp)-Motiv. Bindet c-di-GMP an dieses inhibitorische Zentrum, wird die Synthese weiterer c-di-GMP Moleküle, aus je zwei GTP Molekülen über das Zwischenprodukt (p)ppGpp verhindert. Prinzipiell bindet ein Molekül GTP an je ein Monomer des GGDEF-Domänenproteins, womit dieses immer als Homodimer vorliegen muss. Dieses System der allosterischen Produktinhibition verhindert exzessiven GTP Verbrauch und limitiert die Produktion von c-di-GMP (Kalia *et al.*, 2012). Beispiele dafür sind die Response-Regulatoren PleD aus *Caulobacter crescentus* und WspR aus *Pseudomonas aeruginosa*. Hier bindet ein geknüpft c-di-GMP Dimer an die I-site sowie eine weitere Bindungsstelle und führt damit zur Immobilisierung der GGDEF-Domäne (Malone *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2004).

Phosphodiesterasen teilen sich in die unabhängig voneinander entstandenen EAL-Domänen und HD-GYP(His-Asp- ca. 60aa -Gly-Tyr-Pro)-Domänen enthaltenden Proteine. Das EAL-Motiv schließt die konservierten Aminosäuren Glu-Ala-Leu-x-Arg ein, wobei alternativ zu Alanin auch Val oder Ile funktional sind (Galperin *et al.*, 2001). HD-GYP-Domänen PDEs vollziehen in einem Schritt die Hydrolyse von c-di-GMP zu 2 Molekülen GMP (Guanosinmonophosphat), während EAL-Domänen-enthaltende Proteine oft lediglich das Zwischenprodukt pGpG erzeugen und nur wenige, wie z. B. PdeR aus *E. coli* auch GMP produzieren (Weber *et al.*, 2006). Es war lange unklar wie Bakterien ohne HD-GYP-Domänenproteine wie *E. coli* und *P. aeruginosa* den weiteren Abbau von pGpG zu GMP katabolisieren. Durch die Entdeckung der Oligoribonuclease Orn in *P. aeruginosa* im Jahr 2015 wurde nun womöglich das fehlende Bindeglied zum weiteren Abbau von pGpG zu GMP aufgefunden gemacht (Orr *et al.*, 2015). EAL-Domänenproteine sind ebenfalls als Dimere aktiv. Im Gegensatz zu GGDEF-Domänenproteinen wird diese Quartärstruktur aber nicht für die katalytische Funktion benötigt. Eher kommt der Dimerisierung eine regulatorische Rolle zu, die auf Basis von Kristallstrukturen zu einem Muschel-ähnlichen Klappmechanismus führt und die Aktivität des EAL-Dimers reguliert (Jenal *et al.*, 2017; Sundriyal *et al.*, 2014). Die Aktivität aller PDEs ist dabei abhängig von metallischen Kofaktoren wie  $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ , während  $Ca^{2+}$  eine stark inhibierende Wirkung auf die Enzymaktivität hat (Schmidt *et al.*, 2005).

Hybridproteine enthalten sowohl eine GGDEF- als auch eine EAL- bzw. HD-GYP-Domäne, von denen meist aber eine Domäne enzymatisch inaktiv ist. Diesen inaktiven Domänen werden meist neue Funktionen zuteil, wie die Bindung eines Substrates ohne dessen Spaltung oder das Eingehen von Protein-Protein- bzw. Protein-RNA-Interaktionen (Römling

*et al.*, 2013). Ein typisches Beispiel für einen solchen Mechanismus ist das Hybridprotein PdeA aus *Caulobacter crescentus*. Dessen enzymatisch inaktive GGDEF-Domäne kann GTP binden und damit den Abbau von c-di-GMP durch die benachbarte EAL-Domäne aktivieren (Christen *et al.*, 2005). Eines von wenigen bifunktionalen Enzymen mit GGDEF- und EAL-Domäne ist BphG1 und befindet sich in *Rhodobacter sphaeroides*. Gekoppelt an ein PAS-GAF-PHY photosensorisches Modul können damit reversibel Lichtsignale wahrgenommen werden und den c-di-GMP Spiegel der Zelle modulieren (Tarutina *et al.*, 2006).

Degenerierte Proteine liegen vor, wenn die ursprüngliche Aktivität c-di-GMP abzubauen oder zu synthetisieren durch stark veränderte GGDEF- und EAL- bzw. HD-GYP-Motive verloren gegangen ist. Einige dieser Proteine sind noch in der Lage eine Bindung mit ihrem Substrat einzugehen und stellen somit möglicherweise eine evolutionäre Zwischenstufe bis hin zur völligen Degeneration dar (Hengge, 2009). Die Bindung des Substrats führt dann nicht zur Umsetzung, sondern zur allosterischen Kontrolle einer benachbarten Domäne wie bei dem oben genannten Protein PdeA aus *C. crescentus* oder zur Ausübung einer Effektoraktivität im Fall von LapD aus *P. fluorescenz* (Newell *et al.*, 2009; Christen *et al.*, 2005). In *Escherichia coli* existieren vier solcher degenerierter Proteine. Der als Antirepressor wirkende Blaulicht Rezeptor BluF besitzt eine N-terminale BLUF („blue light using FAD“-)-Domäne, gekoppelt an eine EAL-Domäne, die c-di-GMP weder umsetzen noch binden kann (Tschowri *et al.*, 2009). CsrD hingegen besitzt sowohl eine GGDEF- also auch eine EAL-Domäne, die aber so stark degeneriert sind, dass beide Aktivitäten verloren gegangen sind. Stattdessen führt CsrD zur Degradierung der kleinen nicht-kodierenden RNAs CsrB und CsrC durch die RNaseE (Suzuki *et al.*, 2006). Die degenerierte EAL-Domäne von RflP bindet direkt an den Masterregulator der Flagellensynthese FlhDC und unterbindet damit die Aktivierung der Klasse 2 Gene in der flagellaren Kaskade (Wada *et al.*, 2012). Die Funktion des degenerierten GGDEF-Domänenproteins Yeal (CdgI) ist noch weitestgehend unbekannt, jedoch deutet eine inaktive A-site verbunden mit einer c-di-GMP bindenden aktiven I-site auf eine Funktion als c-di-GMP-Effektorprotein hin.

### 1.3.2 Komplexität c-di-GMP abhängiger Signaltransduktion

Sekundäre Botenstoffe wie c-di-GMP sind Moleküle, die durch einen Rezeptor wahrgenommene Signale an der Oberfläche der Zelle an Zielmoleküle innerhalb der Zelle weiterleiten. Damit sind sie Teil von diversen Signaltransduktionskaskaden, welche Einfluss auf die Physiologie der Zelle haben. Um diese Signalweiterleitung effizient gestalten zu können, werden vier grundlegende Einheiten benötigt welche, die Basis eines c-di-GMP Kontrollmoduls darstellen. Essentiell sind DGCs und PDEs, die durch ihre N-terminalen



Sensordomänen auf verschiedene äußere Signale reagieren und damit den c-di-GMP-Spiegel regulieren können. Die Bindung von c-di-GMP an einen Effektor, führt dann zur Regulation einer Zielstruktur. Solche Zielstrukturen können Promotoren von Genen, Enzyme oder komplexe zelluläre Strukturen wie der flagellare Basalkörper oder der Exopolysaccharid-Synthese und -Sekretionsapparat sein (Povolotsky & Hengge, 2012). Im Gegensatz zu anderen sekundären Botenstoffen wie cAMP in *E. coli*, moduliert durch nur eine Adenylatzyklase und eine spezifische PDE zur Kontrolle des Effektors CRP, wird c-di-GMP in den meisten Bakterienspezies durch eine Vielzahl von DGCs und PDEs reguliert und führt zu multiplen Reaktionen der Zelle (Hengge, 2009). Der Laborstamm *Escherichia coli* K-12, der ein wichtiger Modellorganismus zur Untersuchung c-di-GMP abhängiger Signaltransduktion ist, kodiert für 12 GGDEF-Domänenproteine, 10 EAL-Domänenproteine und 7 Proteine welche beide Domänen enthalten. Auf der Grundlage von biochemischen Vorhersagen und bereits vorhandenem Wissen, sind 12 dieser Genprodukte aktive DGCs, 13 aktive PDEs und 4 beinhalten degenerierte GGDEF- oder EAL-Motive und sind somit enzymatisch nicht funktional (Povolotsky & Hengge, 2015). Diese Vielfältigkeit ergibt die Frage nach dem Sinn einer solchen Menge an auf den ersten Blick redundant wirkenden Enzymen. Tatsächlich führt die Deletion oder Überexpression einzelner, für diese Proteine kodierenden Gene, zu komplett unterschiedlichen und teilweise sehr signifikanten Phänotypen oft ohne eine Veränderung des zellulären c-di-GMP Pools. Daher bietet das System der zeitlichen und/oder räumlichen Sequestrierung von einzelnen Komponenten, aber auch ganzen c-di-GMP Regulationsmodulen, eine elegante Lösung dieses Problems (Hengge, 2009).

Die temporale Trennung c-di-GMP-modulierender Enzyme erfordert eine präzise Kontrolle von Expression und Proteolyse. In wachsenden *E. coli* Zellen werden nur wenige der 29 GGDEF- und EAL-Domänen-enthaltenden Proteine auch in hohem Maße exprimiert (Sommerfeldt *et al.*, 2009). Dazu gehört die Phosphodiesterase PdeH, die in der postexponentiellen Wachstumsphase dazu beiträgt, den zellulären c-di-GMP-Spiegel niedrig zu halten und somit dessen Interaktion mit dem Effektorprotein YcgR zu unterbinden (Reinders *et al.*, 2015; Hengge, 2009; Jenal & Malone, 2006; Sarenko *et al.*, 2017). Hat YcgR c-di-GMP über die PilZ-Domäne gebunden, führt dies zur Inhibition der Flagellenrotation und somit zu verminderter Motilität. Beide Proteine befinden sich unter direkter Kontrolle des flagellaren Masterregulators FlhDC und sind demnach direkt verknüpft mit der Expression von Flagellen (Abb. 3: blau hinterlegt) (Hengge, 2009; Paul *et al.*, 2010; Boehm *et al.*, 2010). Aufgrund inverser Regulation der Genexpression von RpoS und RpoD wird die Transkription FlhDC-aktivierter Gene beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase verhindert oder dessen Genprodukte der Proteolyse zugeführt. FlhDC selbst wird ebenfalls zum Gegenstand proteolytischen Abbaus, vermittelt durch das ClpXP-

System und Lon-Proteasen. Durch fortschreitende Zellteilung kommt es zusätzlich zur Ausdünnung weiterer Komponenten der exponentiellen Wachstumsphase wie PdeH und YcgR (Pesavento *et al.*, 2008; Pesavento & Hengge, 2012).

Viele der GGDEF- und EAL-Domänenproteine stehen unter der Kontrolle von RpoS und werden folglich unter generellen Stressbedingungen zur Expression gebracht. Zwei dieser  $\sigma^S$ -abhängigen Gene kodieren für die DGCs DgcE und DgcQ, dessen Aktivität einen Anstieg von c-di-GMP bewirkt. Neben der daraus resultierenden Inhibition der Flagellenrotation wird in dieser Phase die Synthese der Curli-Fasern aktiviert (Barembuch & Hengge, 2007; Pesavento & Hengge, 2012; Sommerfeldt *et al.*, 2009). Zusammen mit dem MerR-ähnlichen Transkriptionsfaktor MlrA der Cyclase DgcM und dem Trigger-Enzym PdeR kommt es zu einer c-di-GMP abhängigen Aktivierung der CsgD Expression (Hengge, 2016; Lindenberg *et al.*, 2013). Trigger-Enzyme sind in der Regel multifunktional, im speziellen Fall von PdeR handelt es sich um eine enzymatische und eine inhibitorische Funktion. Bei einem geringen c-di-GMP Spiegel inhibiert PdeR, die ebenfalls RpoS-abhängig transkribierten Genprodukte DgcM und MlrA durch direkte Interaktion. Steigt der Spiegel von c-di-GMP in der postexponentiellen Wachstumsphase, übernimmt PdeR verstärkt die Funktion einer aktiven PDE und entlässt DgcM und MlrA, so dass diese die Transkription von CsgD aktivieren können (Abb. 3: rot hinterlegt) (Lindenberg *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2006).

Zur eigentlichen Ausführung seiner Funktionen benötigt c-di-GMP Effektoren, die durch die Bindung eine allosterische Veränderung von Struktur und Wirkungsweise erfahren. Solche Effektoren sind divers und beinhalten mRNA-Riboswitches, Transkriptionsfaktoren, PilZ-Domänenproteine wie auch degenerierte GGDEF/EAL-Domänenproteine (Jenal *et al.*, 2017; Hengge *et al.*, 2015b; Hengge, 2016). Die bereits im oberen Abschnitt erwähnten Proteine YcgR und BcsA binden c-di-GMP über ihre PilZ-Domäne, was zur Aktivierung dieser Effektoren im Kontext der Flagellenbewegung und Cellulose-Produktion führt (Ryjenkov *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2014; Boehm *et al.*, 2010).

PilZ-Domänenproteine wurden als eine der ersten Effektoren beschrieben wobei die Bindung des sekundären Botenstoffes über ein konserviertes RRxxxR- und D/NxSxxG-Motiv erfolgt (Amikam & Galperin, 2006; Benach *et al.*, 2007). Transkriptionsfaktoren stellen eine weitere Gruppe c-di-GMP bindender Effektoren dar und regulieren Prozesse wie die Produktion von EPS durch FleQ, einer ATPase in *P. aeruginosa* (Matsuyama *et al.*, 2016; Baraquet & Harwood, 2013; Hickman & Harwood, 2008). Als Ligand von Riboswitches bietet c-di-GMP die Möglichkeit auch in die Translation einzugreifen (Hengge, 2010). Zu den erst kürzlich beschriebenen Effektoren gehören die Mitglieder der YaiQ-Proteinfamilie, welche in *P. aeruginosa* die bakterielle Virulenz regulieren (An *et al.*, 2014). Multifunktionale Trigger-Enzyme wie PdeR und PdeL aus *E. coli* sind ebenfalls neuartige c-di-GMP-Effektoren mit komplexen Wirkungsmechanismen (Hengge, 2016). Durch das Einsetzen von c-di-GMP-

gekoppelten Magnetic Beads in Pull-Down Assays oder durch spezifische Capture Compounds werden immer mehr neue Effektoren gefunden, deren Wirkungsweise es gilt aufzuklären (Nesper *et al.*, 2012; An *et al.*, 2014).

### 1.3.3 Sensordomänen kontrollieren die Aktivität von DGCs und PDEs

Um Umweltsignale wahrnehmen zu können und diese adäquat in den Zellmetabolismus zu integrieren, besitzen c-di-GMP-umsetzende Enzyme an ihrem N-Terminus Sensordomänen. Eingebunden in die Cytoplasmamembran sorgt oft eine periplasmatische Schleife für die Erkennung von kleinen Liganden oder periplasmatischen Proteinen und Molekülen. Aber auch zellinterne Signale können durch cytoplasmatische Sensordomänen wahrgenommen und integriert werden. Einige dieser Sensordomänen scheinen spezifisch für die Signalweiterleitung durch c-di-GMP zu sein, andere hingegen bedienen auch unabhängige Signalwege. Die Bandbreite der eingehenden Signale ist groß und betrifft die Wahrnehmung von Sauerstoff, Redoxzuständen, Lichtveränderungen sowie Fluktuationen im Nährstoffangebot aber auch extrazelluläre Substanzen wie Antibiotika, Polyamine oder interzelluläre Signalmoleküle werden erkannt. Wahrgenommen werden diese durch cytoplasmatisch lokalisierte PAS(Per, Arndt, Sim)- und GAF-Domänen oder membrangebundene Cache-, CHASE- oder MASE-Domänen (Jenal & Malone, 2006; Hengge *et al.*, 2015b). In *E. coli* wurden zudem neue Arten von Signaldomänen systematisch determiniert: die GAPES(„Gammaproteobacterial Periplasmic Sensory Domain“)-Domänen kommen in 4 GGDEF/EAL-Proteinen vor und scheinen auch auf solche beschränkt zu sein (Hengge *et al.*, 2015b).

PAS-Domänen binden diverse enzymatisch oder nichtenzymatisch wirkende Effektoren, die einer Fülle von zellulären Signalsystemen in Bakterien wie auch in Archaea und Eukaryoten dienen. In Bakterien befindet sich die PAS-Domäne oft am Amino-Terminus von Signalproteinen, wie HSKs („Histidin Sensor Kinases“), DGCs, PDEs oder MCPs („Methyl-accepting Chemotaxis proteins“). Obwohl die Sequenzen dieser Domänen sehr variabel sind, ist die dreidimensionale Architektur hochkonserviert. Die Topologie, innerhalb oder außerhalb der Plasmamembran und die Art der gebundenen Moleküle, bestimmen die strukturellen Eigenschaften dieser Proteinfamilie. Die Variabilität der Domänen im Hinblick auf wahrnehmbare Umweltreize ist groß und beinhaltet Ionen, Gase wie Sauerstoff oder Kohlenstoffmonoxid, Licht und Redoxzustände. Kleine Moleküle und Ionen können direkt gebunden werden und als eingehendes Signal dienen oder stellen Kofaktoren dar, wie im Fall der Erkennung von Redoxpotentialen durch FAD (Flavin-Adenin-Dinucleotid) oder dem Wahrnehmen von Licht durch Flavine (Shimizu, 2013; Henry & Crosson, 2011). Prominenter Vertreter eines c-di-GMP-degradierenden Häm-basierten PAS-Domänenproteins in *E. coli*

ist PdeO (DosP). Zusammen mit der Sensor-Globin-gekoppelten DGC DgcO (DosC) reagiert das System auf Veränderungen der Sauerstoffverfügbarkeit und führt zur Destabilisierung bestimmter mRNAs. Dieses System stellt ebenfalls einen makromolekularen Komplex dar, der fähig ist lokale c-di-GMP Spiegel zu generieren (Donné *et al.*, 2016; Tagliabue *et al.*, 2010; Tuckerman *et al.*, 2011). Während *E. coli* K-12 für mehrere PAS-Domänen gekoppelte DGCs und PDEs kodiert, tritt die GAF-Domäne lediglich bei einem Multidomänenprotein auf (Hengge *et al.*, 2015a). GAF-Domänen binden vornehmlich kleine Liganden, wie die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP, die genaue Funktion dieser Domänen ist jedoch noch weitestgehend ungeklärt.

Zur Wahrnehmung von Signalen außerhalb des Cytoplasmas sind Proteine mit Membran-assoziierten Domänen, wie die aus mehreren Transmembranhelices bestehende MASE-Domäne oder die im Periplasma lokalisierten Cache-, GAPES- oder CHASE-Domänen von Bedeutung (Hengge, 2016; Anantharaman & Aravind, 2000; Nikolskaya *et al.*, 2003; Upadhyay *et al.*, 2016). Aktuell sind nur einige wenige Cache-Domänen funktionell und strukturell charakterisiert, wobei die meisten davon Monocarboxylat binden aber auch Verbindungen mit mehreren Carboxy-Gruppen sind möglich (Brewster *et al.*, 2016). In *E. coli* besitzen die Proteine DgcQ und PdeI eine Cache-Domäne. DgcQ konnte in Zusammenhang mit einer CsgD-unabhängigen Induktion von Cellulose und Biofilmbildung gebracht werden, während die Funktion von PdeI noch unbekannt ist (Da Re & Ghigo, 2006). Die CHASE(„cyclase/histidine kinase associated sensing extracellular“-)Domänen sind weit weniger verbreitet und kommen auch im Verbund mit Sensorhistidinkinasen und Nukleotidcyclasen oder -hydrolasen vor (Zhulin *et al.*, 2003). DgcN ist eine bifunktionale CHASE-HAMP-Domänen-gekoppelte DGC in kommensalen und uropathogenen *E. coli*-Stämmen, welche auf Redox- und Zellhüllstress unterschiedlich reagiert. Unter reduzierenden Bedingungen führt die Inaktivierung ihres Inhibitors YfiR zu erhöhten c-di-GMP-Spiegeln und damit assoziierter verstärkter Biofilmbildung. Kommt Zellhüllstress unter diesen Bedingungen dazu, geht YfiR einen Komplex mit FtsZ und ZipA ein und unterbindet die Zellteilung (Kim & Harshey, 2016). In Abhängigkeit von dem DSB(„disulfide bond system“-)System (siehe Abschnitt 1.4.1), welches für die korrekte Faltung des Inhibitors YfiR essentiell ist, wird die CsgD-unabhängige Produktion von Cellulose demnach indirekt reprimiert (Hufnagel *et al.*, 2014). Die Rolle der verschiedenen MASE(1,2)-Domänen bei der Signalwahrnehmung ist noch relativ unklar. C-di-GMP umsetzende Proteine, die solche sensorischen Domäne besitzen, sind u.a. PdeF und DgcC (Nikolskaya *et al.*, 2003; Hengge *et al.*, 2015a).

Einige GGDEF/EAL-Domänenproteine beinhalten auch mehrere sensorische Domänen, sodass potentiell ein Protein verschiedene Signale wahrnehmen und in die zellulären Abläufe integrieren kann (Hengge *et al.*, 2015a). Die Synthese oder der Abbau von c-di-

GMP kann ebenfalls über die Vermittlung von Zwei-Komponenten-Systemen (ZKSs) erfolgen, bestehend aus Signal-wahrnehmender Histidinkinase und integrierendem Responseregulator werden hier über Phosphorylierungskaskaden zelluläre Prozesse gesteuert (Forst *et al.*, 1989; Jubelin *et al.*, 2005).

## 1.4 Redoxhomöostase und Proteolyse im Periplasma

*E. coli* ist ein fakultativ anaerob lebender Organismus, das heißt er wächst optimal in der Gegenwart von Sauerstoff, kann aber auch unter anaeroben Bedingungen überleben indem er seinen Stoffwechsel auf Gärungsprozesse umstellt. Der anaerobe Stoffwechsel ist dabei an enge Optima gebunden. Steigt der O<sub>2</sub>-Gehalt der Umgebung und erreicht suboptimale Konzentrationen, kommt es zu oxidativem Stress in der Zelle (Imlay, 2013; Imlay, 2002). Damit verbunden sind oft Schädigungen diverser redox-sensitiver Komponenten wie Eisen-Schwefel-Cluster, Cysteinreste von Proteinen oder die DNA, in welcher es dann gehäuft zu Mutationen kommt. Unter normalen Wachstumsbedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Oxidation durch molekularen Sauerstoff oder reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der antioxidativen Kapazität der Zelle (Ströher & Dietz, 2006; Droge, 2002). Oxidativer Stress entsteht erst beim Verlust dieser Balance und der vermehrten Akkumulierung von ROS. Durch die schrittweise Elektronenaufnahme von O<sub>2</sub> entsteht zunächst das Hyperoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) gefolgt von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und dem Hydroxyl-Radikal (HO). Bei einem aeroben Metabolismus ist das Entstehen von Reaktiven Sauerstoffspezies unvermeidlich und Produkt der Autooxidation von Flavin-Kofaktoren-enthaltenden Redoxenzymen der Atmungskette (Messner & Imlay, 1999). Ebenso können Flavoproteine, die nicht an der Zellatmung beteiligt sind, wie die Glutathionreduktase oder die Glutamatsynthase zur Entstehung von ROS beitragen indem sie mit O<sub>2</sub> reagieren (Imlay, 2013; Korshunov & Imlay, 2010). Zudem werden durch einen oxidativen Burst im Zusammenhang mit der Immunabwehr pathogene Bakterien verstärkt mit reaktiven Sauerstoffspezies konfrontiert (Forman & Torres, 2001). In seiner reduzierten Form trägt außerdem Eisen (Fe<sup>2+</sup>) zu einer Potenzierung Sauerstoff-abhängiger Toxizität bei, indem es durch die Fenton-Reaktion weniger reaktives H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in das stark reaktive Hydroxyl-Radikal umwandelt. Daher ist auch eine strikte und aufwendige Regulation des Eisenhaushaltes und die Aufrechterhaltung eines niedrigen Spiegels an freiem Eisen zur Vermeidung oxidativen Stresses notwendig (Touati, 2000b). Des Weiteren kann Photooxidation durch Licht in Anwesenheit von Sauerstoff zu vermehrten Oxidationsreaktionen und zu der Entstehung von ROS beitragen (Scoffone *et al.*, 1970).

Bakterien reagieren auf oxidativen Stress mit der Aktivierung einer globalen Antwort zur Eliminierung der reaktiven Sauerstoffspezies und zur Reparatur der durch die Oxidation

entstandenen Schäden (Blanchard *et al.*, 2007; Ziegelhoffer & Donohue, 2009). Die Wahrnehmung und Regulation im Cytoplasma von *E. coli* erfolgt, neben der Induktion der generellen Stressantwort, durch das Wasserstoffperoxid-wahrnehmende OxyR-System sowie das Hydroxyl-Radikal-erkennende SoxRS-System und führt zur Expression von Superoxiddismutasen und Katalasen, welche direkt mit den ROS interagieren und diese unschädlich machen können (siehe Abschnitt 1.4.3) (Green & Paget, 2004; Blanchard *et al.*, 2007; Chiang & Schellhorn, 2012).

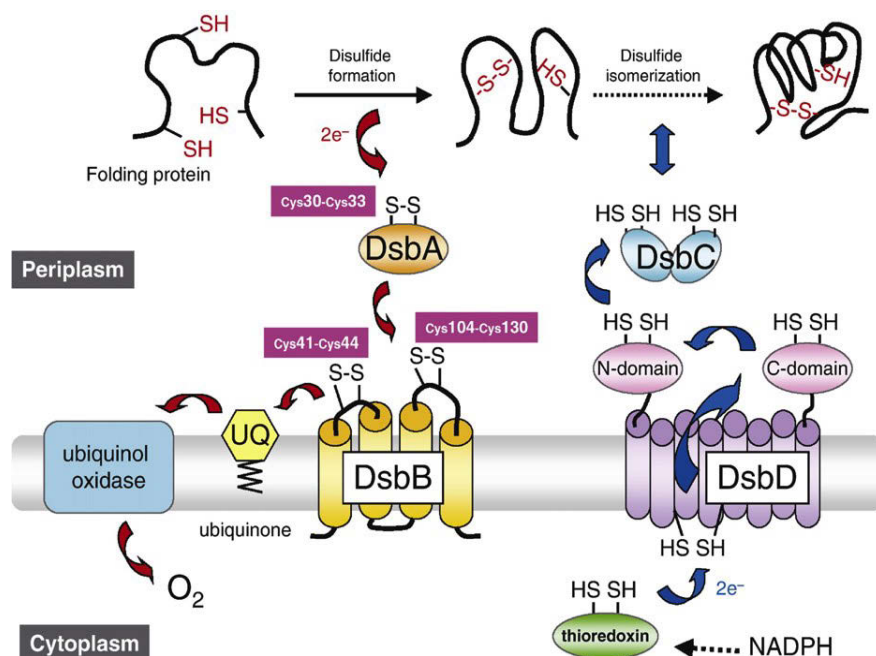
Aufgrund des porösen Charakters der äußeren Membran in gram-negativen Bakterien ist das Periplasma, verglichen mit dem Cytoplasma, äußeren Umweltbedingungen, die zu Redoxstress führen können, viel stärker ausgesetzt. Daher wird auch und insbesondere hier ein ausgeklügeltes System zum Schutz und zur Vermeidung von Schäden, die solcher Stress nach sich ziehen kann, benötigt (Merdanovic *et al.*, 2011).

Eine zentrale Rolle bei der Wahrnehmung von Redoxzuständen spielen Cysteine. Sie sind Ziel diverser reversibler und irreversibler posttranslationaler Thiol-Modifikationen. Dabei kann die Thiolgruppe (-SH) reversibel zu einem Disulfid (-S-S-) oder einer Sulfensäure (-SOH) oxidiert werden oder irreversibel zu Sulfin- (-SOH<sub>2</sub>) bzw. Sulfonsäure (-SO<sub>3</sub>H). Die Oxidation von Thiolgruppen kann spontan in Anwesenheit von Sauerstoff erfolgen, wobei diese Reaktion eher langsam ist und nicht zwangsweise die korrekten Cysteinpaare miteinander verknüpft. Effektiver sind Protein-Disulfide-Isomerasen (PDIs). Durch ihre Fähigkeit effektiv und gezielt Disulfidbrücken zu bilden oder aufzubrechen, tragen sie zu einem stabilen Redoxgleichgewicht in der Zelle bei (Green & Paget, 2004; Hillion & Antelmann, 2015; Anfinsen & Haber, 1961; Inaba, 2009). PDIs sind in den meisten Organismen extracytoplasmatisch lokalisiert. Ausnahmen zeigen lediglich einige Thermophile und Virus-infizierte Zellen (Inaba & Ito, 2008; Su *et al.*, 2006; Ladenstein & Ren, 2006). Das DSB(Disulfidbrücken)-System im Periplasma von *E. coli* ist zentraler Dreh- und Angelpunkt für die Bildung und Hydrolyse von Disulfidbrücken und stabilisiert damit sekretierte Proteine in ihrer nativen und funktionalen Konformation (Abb. 5) (Arts *et al.*, 2015; Inaba, 2009; Depuydt *et al.*, 2009).

#### 1.4.1 Das Disulfidbrücken(DSB)-generierende System in *E. coli*

Es wird angenommen, dass *E. coli* ca. 400 periplasmatische Proteine beherbergt. Durch die hohe Proteinkonzentration ist das Periplasma hochviskos und enthält nur wenig freies Wasser. Die dort lokalisierten Proteine sind essentiell für das Wachstum und die Lebensfähigkeit der Zelle, sie beinhalten Transportsysteme für Nährstoffe und extrazelluläre Matrixsubstanzen, Entgiftungsmaschinerien und Protein-Faltungshelfer (Goemans *et al.*, 2014; Leverrier *et al.*, 2010; Arts *et al.*, 2015). Sekretierte Proteine werden zunächst im

Cytoplasma synthetisiert und gelangen dann über verschiedene Sekretionssysteme in das Periplasma. Die Mehrheit trägt dabei eine kurze N-terminale Signalsequenz, die von dem Sec-Transportapparat erkannt wird. Nur ein geringer Teil gelangt über den Twin-Arginin-Transportweg (Tat) in das Periplasma (Osborne *et al.*, 2005; Natale *et al.*, 2008). Die Translokation der Proteine erfolgt in einem ungefalteten Zustand. Aus diesem Grund befindet sich eine hohe Anzahl von Faltungshelfern im Periplasma. Chaperone sind solche Helfer und assistieren bei der Faltung, verhindern Aggregation und sind wichtig für den Transport sowie die Insertion der Außenmembranproteine (OMPs = „outer membrane proteins“). Ein wichtiger Schritt zu einem korrekt gefalteten und funktionalen Protein im Periplasma ist die Bildung von Disulfidbrücken. Im Gegensatz zu früheren Annahmen, dass die Oxidation der freien Thiolgruppen der Proteine im Periplasma spontan in Anwesenheit von Sauerstoff erfolgt weiß man heute, dass daran katalysierende Enzyme beteiligt sind (Bardwell *et al.*, 1991; Goemans *et al.*, 2014; Leverrier *et al.*, 2010). Diese Enzyme werden durch das DSB-System gestellt, welches sich aus einem oxidierenden und einem reduzierenden Signalweg zusammensetzt und Gegenstand diverser wissenschaftlicher Reviews ist (Abb. 5) (Goemans *et al.*, 2014; Cho & Collet, 2013; Inaba, 2009; Depuydt *et al.*, 2009; Ito & Inaba, 2008).



**Abb. 5: Das System zur Generierung von Disulfidbrücken im Periplasma von *E. coli*.** Neu in das Periplasma transferierte, noch ungefaltete Proteine werden durch DsbA oxidiert und bilden eine Disulfidbrücke aus. Die Elektronen des Substrats überträgt DsbA auf das membranständige Protein DsbB, von wo aus sie über Quinone in die Atmungskette eingespeist werden. Nicht-native Disulfidbrücken können durch DsbC wieder reduziert und damit korrigiert werden. Die Reduktion von DsbC erfolgt durch DsbD, welches die dazu nötigen Elektronen aus dem Thioredoxin-System erhält. DsbA/B bilden demnach den oxidierenden und DsbC/D den reduzierenden Reaktionsweg dieses Systems (aus Inaba and Ito, 2008).

Den oxidierenden Signalweg bilden das Membranintegrierte Protein DsbB und das lösliche Protein DsbA. DsbA besitzt eine Thioredoxin-Domäne mit katalytisch aktivem Cys-XX-Cys-Motiv und hat das zweithöchste Redoxpotential aller bekannten Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen. Daher trägt es maßgeblich zu der stark oxidierenden Umgebung des Periplasmas bei, in der die Mehrzahl der Cysteinreste in Disulfiden arrangiert ist (Quan *et al.*, 2007; Wunderlich & Glockshuber, 1993). Das Disulfid entsteht durch einen nukleophilen Angriff des Substrats auf das erste Cystein in DsbA, dabei wird ein gemischter Disulfid-Komplex aus beiden Proteinen gebildet. Der Angriff von dem 2. Cystein des Substrats führt dann zur kompletten Oxidation von diesem und hinterlässt DsbA im reduzierten Zustand (Kadokura & Beckwith, 2009; Kahn *et al.*, 2015; Goemans *et al.*, 2014). Es konnten bereits einige Substrate von DsbA identifiziert werden, darunter sind Virulenzfaktoren, RpoE-induzierte Gene, die Endonuklease RNase I, die Außenmembranproteine OmpR und OmpX sowie die periplasmatische Protease DegP. Es wird angenommen, dass DsbA mehr oder weniger willkürlich Disulfidbrücken zwischen, in der Primärsequenz aufeinanderfolgenden Cysteinen einfügt. Eine Ausnahme hiervon bildet bis zum heutigen Zeitpunkt nur die RNase I (Messens *et al.*, 2007; Kurth *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2014; Kadokura *et al.*, 2004; Vertommen *et al.*, 2008). Nach dem erfolgten Disulfid-Austausch muss DsbA reoxidiert werden. Dies geschieht durch DsbB, welches seine überschüssigen Elektronen an Quinone weiterleitet und somit eine Verbindung zur Atmungskette herstellt (Bader *et al.*, 2000; Inaba & Ito, 2008).

Durch die Vorliebe von DsbA in der Primärsequenz benachbarte Cysteinreste zu einer Disulfidbrücke zu verbinden, kommt es immer wieder zu unkorrekten Faltungen weit auseinanderliegender Cysteine. In diesem Fall kommt der reduzierende Signalweg des DSB-Systems zum Zug (Rietsch *et al.*, 1997; Cho & Collet, 2013; Depuydt *et al.*, 2009). Hauptakteur ist hier das periplasmatische Protein DsbC, welches als Homodimer aktiv ist. Im Gegensatz zu DsbA werden die katalytischen Cysteine der Thioredoxin-Domäne reduziert gehalten, was es DsbC erlaubt, als Reduktase oder Isomerase zu fungieren (Rietsch *et al.*, 1996). DsbG ist DsbC strukturell sehr ähnlich und liegt ebenfalls als Homodimer mit je einer Thioredoxin-Domäne löslich im Periplasma vor. Die Unterschiede zeigen sich in ihrer Substratspezifität (Denoncin *et al.*, 2014; Vertommen *et al.*, 2008; Rietsch *et al.*, 1997). DsbC scheint vornehmlich mit Proteinen zu interagieren, die teilweise sulfenyliert und noch ungefaltet sind, während DsbG eher globuläre bereits oxidierte Proteine bindet. Ursache hierfür könnte die im Vergleich zu DsbC, größere und hydrophilere Spalte zwischen den V-förmig angeordneten Homodimeren sein (Arts *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu DsbA sind für DsbC nur einige wenige Substrate bekannt. Darunter befindet sich ebenfalls die RNase I, das Lipopolysaccharid Transportprotein LptD und die Sensorkinase des Rcs-Phosphorelaysystems RcsF (Vertommen *et al.*, 2008; Denoncin *et al.*, 2010; Leverrier *et al.*,



2011). DsbG hingegen stabilisiert die korrekte Faltung von L,D-Transpeptidasen (Depuydt *et al.*, 2009). Beide Oxidoreduktasen werden, nachdem sie ihre Elektronen auf das Substrat übertragen haben, durch DsbD wieder in ihren reduzierten Zustand gebracht. DsbD befindet sich in der inneren Membran und katalysiert den Transfer von Elektronen, welche durch das cytoplasmatisch lokalisierte Thioredoxin-System bereitgestellt werden. Thioredoxin (Trx) wird von der Thioredoxin-Reduktase (TrxR) unter NADPH-Verbrauch reduziert. Durch seine starke Disulfid-Reduktase-Aktivität trägt es hauptsächlich zum Schutz vor oxidativem Stress im Cytoplasma bei (Cho & Collet, 2013; Arts *et al.*, 2015; Lu & Holmgren, 2013). Das DSB-reduzierende System bildet also die Grundlage zur Erhaltung der Redoxhomöostase im Periplasma bei oxidativen Stressbedingungen unter denen es vermehrt zur Fehlfaltung von Proteinen kommt. Komplementiert wird dieses System durch diverse Chaperone und Proteasen, die bei der Faltung von Proteinen helfen oder in letzter Konsequenz das Protein degradieren und somit einer Akkumulierung von Proteinaggregaten entgegenwirken (Merdanovic *et al.*, 2011; Hansen & Hilgenfeld, 2013).

#### 1.4.2 Die Familie der HtrA-Proteasen

Aufgrund der hohen Anzahl an Proteinen, ihrer unterschiedlichen Eigenschaften und Häufigkeiten, beherbergt das Periplasma diverse Systeme zur Proteinqualitätskontrolle, Reparatur und Degradierung (Ehrmann & Clausen, 2004). Bei auftretenden Fehlfaltungen oder Mislokalisationen von Proteinen wird zum einen der RpoE-abhängige Signaltransduktionsweg aktiviert. Durch die Dissoziation des RseA/RseB Komplexes und der damit verbundenen Aktivierung der Protease DegS, durch exponierte C-Termini falsch lokalisierter OMPs, kommt es zum sequentiellen Abbau des Antisigmafaktors RseA. Neben DegS ist auch die Protease RseP sowie das ClpXP/Lon-System am Abbau beteiligt, durch den es zur Freisetzung von RpoE ins Cytosol und Aktivierung diverser Stress-induzierter Promotoren kommt (Merdanovic *et al.*, 2011). Zum anderen wird das CpxAR-Zwei-Komponenten-System bei Fehlfaltungen von Proteinen der inneren Membran oder des Periplasmas, sowie NlpE vermittelt bei der Adhäsion an abiotische Oberflächen, aktiviert. Es ist indirekt über kleine RNAs und direkt über die Inhibierung des *rpoE*-Gens durch den Responseregulator CpxR mit dem RpoE-System verbunden. Die antagonistische Zusammenarbeit dient dem Schutz von innerer Membran und Cytosol, vor allem vor fehlgefalteten oder falsch lokalisierten OMPs (Grabowicz & Silhavy, 2017).

Ein gemeinsames Ziel transkriptioneller Regulation dieser beiden Systeme zeigt sich anhand der Aktivierung von *degP*. Initial wird die Transkription des Gens, welches für die Protease DegP kodiert, RpoE-abhängig bei Zellhüllstress aktiviert. Zu einer Induktion der Expression kommt es, wenn zusätzlich phosphoryliertes CpxR an den Promotor von *degP*

bindet. DegP seinerseits trägt zur Aktivierung von CpxR bei, indem es den Komplex aus CpxP und fehlgefaltetem Protein degradiert. Durch den Entzug von CpxP ist die Sensorkinase CpxA frei und kann CpxR durch Phosphorylierung aktivieren. Neben DegP wird auch die Transkription der periplasmatischen Oxidoreduktase DsbA positiv durch das Cpx-System reguliert (Dorel *et al.*, 2006; Meltzer *et al.*, 2009).

Die Protease DegP (HtrA) gehört zu einer stark konservierten Proteinfamilie, wie sie in allen lebenden Organismen zu finden ist (Page & Di Cera, 2008). Prokaryotische HtrA(high-temperature requirement A)-Proteasen sind in Prozesse wie die Hitzeschockantwort und Toleranz gegenüber strengen Umweltbedingungen, hervorgerufen durch hohe Temperaturen, extreme pH-Werte oder erhöhten oxidativen Stress, involviert.

Im Gegensatz zu anderen Hitzeschockproteinen benötigen HtrA-Proteasen kein ATP und können sowohl Protease- als auch Chaperon-Aktivität ausüben (Hansen & Hilgenfeld, 2013). Während sie in pathogenen Bakterien einen wichtigen Virulenzfaktor darstellen, spielen humane HtrA-Proteine eine essentielle Rolle bei Zellentwicklungs- und Alterungsprozessen (Clausen *et al.*, 2011; Ingmer & Brøndsted, 2009). Trotz der diversen Funktionen besitzen HtrA-Proteasen eine gemeinsame, modular aufgebaute Domänenstruktur. Die Basis bildet dabei eine N-terminal gelagerte Serin-Protease-Domäne, an die ein oder zwei Proteininteraktionsdomänen des PDZ-Typs angeschlossen sind. Abhängig von der zellulären Lokalisation und Funktion können weitere Domänen sowie Transmembraneinheiten oder Signalsequenzen an den Amino-Terminus geknüpft sein. Auf der Grundlage von Kristallstrukturen zeigt sich, dass alle untersuchten HtrA-Familienmitglieder Homotrimere bilden, die durch umfassende Kontakte zwischen den Protease-Domänen stabilisiert werden. Das Genom von *E. coli* kodiert für 3 HtrA-Homologe: DegS, DegP und DegQ. Im Gegensatz zu der membranintegrierten Protease DegS konnte für DegQ und DegP auch die Formation höherer Oligomere (bis zu 24) beobachtet werden (Krojer *et al.*, 2008b; Meltzer *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2011; Hansen & Hilgenfeld, 2013).

DegP und DegQ sind zudem ähnlich groß und zeigen circa 60% Sequenzhomologie. Zusammen mit der Beobachtung, dass die Überproduktion von DegQ die Temperatursensitivität einer *degP*-Mutante substituieren kann, ist eine ähnliche Substratspezifität beider Proteine naheliegend (Kolmar *et al.*, 1996). In Abwesenheit eines Substrats formt DegP ein proteolytisch inaktives Homohexamer aus zwei trimeren Ringen. Bindet ein Substrat an das aktive Zentrum und die PDZ1-Domäne, erfolgt die Transformation zu einem polyedrischen Käfig, welcher aus 4-6 Trimeren besteht und katalytisch aktiv das Substrat einschließt und degradiert. Die Assemblierung zu einem Käfig ist jedoch für die proteolytische Aktivität nicht zwangsweise notwendig (Krojer *et al.*, 2010; Kim & Sauer, 2014).

In *E. coli* ist DegP essentiell für das Überleben bei hohen Temperaturen. Unter diesen Bedingungen schützt die Proteaseaktivität vor der Akkumulation von aggregierten Proteinen im Periplasma. Liegen die Temperaturen unterhalb von 30°C, übt DegP vornehmlich eine Chaperon-ähnliche Funktion aus, welche bei zusätzlichem Redoxstress auch in eine Proteaseaktivität übergehen kann (Skorko-Glonek *et al.*, 2008; Spiess *et al.*, 1999). Als Protease degradiert DegP eine große Anzahl fehlgefalteter Proteine im Periplasma, darunter PhoA, MalS und diverse OMPs. Es wurde gezeigt, dass besonders nach Aminosäuren wie Ile, Val, Met, Leu, Thr, Ser und Ala durch einen Halte-und-Schnitt-Mechanismus gespalten wird (Goemans *et al.*, 2014; Krojer *et al.*, 2008a). Die Chaperon-Aktivität beschränkt sich zunächst auf die  $\alpha$ -Amylase MalS, dessen Faltung bei niedrigen Temperaturen stimuliert wird. In einigen Fällen verhindert DegP die Aggregation von denaturierten Proteinen durch deren Bindung jedoch ohne Abbau. Es fungiert als sog. Holdase-Chaperon. Aufgrund neuer Untersuchungen wird gegenwärtig die Funktion von DegP als Protease favorisiert, während die Chaperon-Aktivität in den Hintergrund rückt (Spiess *et al.*, 1999; Skorko-Glonek *et al.*, 2008; Chang, 2016).

DegQ hat ebenfalls eine kombinierte Chaperon-Protease-Aktivität und ändert seinen oligomeren Status in Abhängigkeit von der Konzentration des Substrates. Im Gegensatz zu DegP bildet DegQ jedoch auch höhere Oligomere in Abwesenheit von Substrat bei saurem pH. Ein Wachstumsdefekt, wie ihn *degP*-defiziente Stämme zeigen, konnte in *degQ*-Mutanten auch bei erhöhten Temperaturen nicht festgestellt werden. Biochemische Analysen von DegQ-Dodekameren haben gezeigt, dass das Außenmembranprotein OmpA vermehrt gebunden wird und somit ein wichtiges Substrat ist. Verglichen mit DegP konnte in diesem Zusammenhang eine geringere Protease- aber höhere Chaperon-Aktivität nachgewiesen werden (Kolmar *et al.*, 1996; Sawa *et al.*, 2011; Malet *et al.*, 2012). Während in *E. coli* beide Proteine vorkommen, findet man bei vielen anderen Prokaryoten nur ein DegQ-Homolog, welches somit ein Basismodell der HtrA-Proteasen darstellen könnte. DegQ besitzt einen  $\sigma^{70}$ -abhängigen Promotor und wird somit in der vegetativen Wachstumsphase exprimiert. Unter diesen Bedingungen ist DegP teilweise inhibiert. Die Expression und die Induktion der proteolytischen Aktivität erfolgt bei DegP erst unter Hitzeschockbedingungen. Die Etablierung zweier mehr oder weniger redundanter HtrA-Proteasen könnte demnach eine Adaption der Enterobakterien an höhere Temperaturoptima sein, im Gegensatz zu ausschließlich freilebenden Spezies (Onder *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2011).

### 1.4.3 Thiol-basierte Redoxsensoren in Bakterien

Der Metabolismus und die zelluläre Integrität von Bakterien wird durch einen ausgeglichenen Redoxhaushalt stabilisiert. Bei einem Ungleichgewicht, insbesondere hervorgerufen durch oxidativen Stress (ROS), können diverse Zellfunktionen gestört werden (siehe Abschnitt 1.4). Aus diesem Grund haben Zellen sehr sensitive und spezifische Sensoren zu Wahrnehmung von Sauerstoff, Redoxstatus und ROS entwickelt. Diese Sensoren wandeln das eingegangene Redoxsignal in eine zelluläre Antwort um die, meist auf Ebene der Transkription, dafür Sorge trägt sich an die veränderte Redoxsituation anzupassen. Involviert in die Wahrnehmung und Weiterleitung der Signale können Proteine mit redox-aktiven Kofaktoren wie Hämen (DosP), Flavinen (BluF), Pyridinnukleotiden (Arc) oder Eisen-Schwefel-Clustern (SoxR) sein. In dieser Arbeit stehen jedoch die Thiol-basierten Redoxsensoren im Fokus, welche mit der Identifizierung des Peroxidsensors OxyR in *E. coli* als wichtiges regulatorisches Instrument erkannt wurden (Hillion & Antelmann, 2015; Green & Paget, 2004).

Thiol-basierte Redoxsensoren in Bakterien beinhalten die verschiedensten Arten von Transkriptionsfaktoren wie LysR (OxyR), TetR, AraC oder MarR, hinzu kommen Spx- und Zink-assoziierte Sigmafaktoren. Viele dieser Redoxsensoren bedienen sich dabei konservierter Cysteine und reagieren damit nicht nur auf ROS. Ebenso RES („reactive electrophilic species“), wie Diamide und Quinone, Stickstoffmonoxid und hypochlorige Säure (HOCl) können posttranslationale Thiol-Modifikationen auslösen. Thiol-Oxidation spielt auch eine große Rolle bei der Immunabwehr gegenüber pathogenen Erregern. So konnte schon für einige Humanpathogene eine Thiol-basierte Regulation der Virulenz sowie Antibiotikaresistenz beobachtet werden (Hillion & Antelmann, 2015).

OxyR ist ein konservierter redox-aktiver Sensor für Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Stickstoffmonoxid im Cytoplasma gram-positiver wie gram-negativer Bakterien, dessen Funktion als Transkriptionsregulator der LysR-Familie über einen Thiol-Disulfid-Switch aktiviert wird. Die Oxidation von OxyR erfolgt durch die Bildung eines intramolekularen Disulfids zwischen den beiden konservierten Cysteinen C199 und C208 innerhalb aller 4 Untereinheiten des OxyR-Tetramers (Storz *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1998; Chiang & Schellhorn, 2012). Die Bindung an die DNA erfolgt je nach Redoxzustand auf unterschiedliche Weise und legt fest, ob der Einfluss auf die Transkription aktivierend oder reprimierend ist (Kullik *et al.*, 1995; Toledano *et al.*, 1994). In *E. coli* beinhaltet das OxyR-Regulon Gene zur Reduktion von Peroxiden (*ahpCF*), Katalasen (*katG*), den Eisenaufnahmeregulator (*fur*), die Maschinerie zum Aufbau von Eisen-Schwefel-Clustern (*sufABCDE*), die Oxidoreduktase *dsbG* und noch einige weitere Gencluster die zur Detoxifizierung beitragen sollen. Als Repressor kontrolliert OxyR negativ seine eigene

Transkription. Somit kommt es unter vermindertem Peroxidstress zur Autoinhibierung durch vermehrt reduziert vorliegendes OxyR. Unter stressfreien Bedingungen sorgt das Glutaredoxin(GSH)-System für die Reduktion von oxidiertem OxyR (Hillion & Antelmann, 2015; Storz *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 2001). RsrA ist ein weiterer Sensor für Disulfidstress im Cytoplasma, der aber im Gegensatz zu OxyR beschränkt auf gram-positive Aktinomyzeten ist (Kang *et al.*, 1999; Paget *et al.*, 2001).

*Vibrio cholerae* kodiert für gleich zwei membranständige Transkriptionsfaktoren TcpP und ToxR, die in ihrer periplasmatischen Domäne zwei Cysteine besitzen und damit eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden. Am N-Terminus von TcpP und ToxR im Cytoplasma befindet sich, durch eine Transmembrandomäne verbunden, die DNA-bindende Domäne. Beide Transkriptionsfaktoren führen zur Aktivierung von ToxT, dem Hauptaktivator für das Cholera toxin und den Toxin-koregulierten Pilus, sowie der Expression weiterer Virulenzfaktoren. Es wird angenommen, dass TcpP mit der RNAP-Polymerase interagiert und somit der direkte Aktivator des *toxT*-Genes ist, während ToxR lediglich zur Verstärkung der Transkription beiträgt. Beide Regulatoren benötigen periplasmatische Koaktivatoren, die ihre Aktivität durch Induktion der Dimerisierung, wie bei ToxR oder Schutz vor Degradierung, wie im Fall von TcpP unterstützen (Morgan *et al.*, 2015; Krukonis *et al.*, 2000). Die periplasmatischen Cysteine von ToxR scheinen nicht essentiell für die Aktivierung von *toxT* zu sein, die von TcpP hingegen schon (Ottemann & Mekalanos, 1996; Morgan *et al.*, 2015; Almagro-Moreno *et al.*, 2015). Beim Eintritt in den Darm führen äußere Signale zur Expression des *tcpPH*-Operons. Unter diesen Bedingungen führt die Bildung einer Disulfidbrücke, zusammen mit der Bindung des Koaktivators TcpH, zum Schutz vor Degradierung und Expressionsaktivierung des *toxT*-Gens. Kommt es zur Zerstörung der intramolekularen Disulfidbrücke, geht der Schutz durch TcpH verloren und TcpP durchläuft einen sequentiellen Abbau, an dem DegS, Tcp, YaeL und weitere noch nicht identifizierte Proteasen beteiligt sind (Morgan *et al.*, 2015). Weitere Studien in diesem Kontext haben gezeigt, dass TcpP und ToxR DsbA-abhängig Heterodimere bilden, welche unter anaeroben Bedingungen noch verstärkt werden und wichtig für die Induktion der Virulenzgene sind (Fan *et al.*, 2014).

Ein ToxR-ähnlicher Transkriptionsregulator wird auch im Genom von *E. coli* kodiert (Miller & Mekalanos, 1984). CadC ist ein Ein-Komponenten-Signaltransduktionssystem und dient der Adaptation an eine saure Umgebung und Schwankungen bei der Verfügbarkeit von Lysin. Beide Signale werden über die Interaktion von CadC mit der Lysinpermease LysP wahrgenommen. Während das Vorhandensein von Lysin indirekt durch eine Bindung mit LysP signalisiert wird, nimmt CadC pH-Veränderungen direkt über die Modifikation zweier Thiolgruppen in der periplasmatischen Domäne wahr. Durch den Austausch der Cysteine C208 und C272 zu Alanin konnte ein CadC Derivat generiert werden, welches semiaktiv

entweder auf Lysin oder saure pH-Werte reagiert. Dieses Resultat führte zu dem Modell, dass CadC bei neutralem pH eine Disulfidbrücke zwischen oben genannten Cysteinen ausbildet und dadurch inaktiv ist. Daher ist die Bindung von LysP an CadC nicht ausreichend um die Transkription von *cadBA* zu aktivieren. Erst der Wechsel zu einem saurem pH-Wert führt zur Reduktion der DSB und einer strukturellen Umgestaltung, vermittelt durch den cytoplasmatischen Linker, die schlussendlich zur Bindung des CadC-Dimers an die DNA und der Rekrutierung der RNAP führt (Buchner *et al.*, 2015; Schlundt *et al.*, 2017; Tetsch *et al.*, 2011). CadC stellt damit einen pH-Sensor dar, dessen Aktivität direkt über einen Thiol-Disulfid-Switch reguliert wird.

## 2 Zielsetzung

Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP fördert in vielen Bakterienspezies die Ausbildung eines Biofilms. In diesem sind die Zellen umgeben von einer selbstproduzierten, schützenden Matrix, deren Hauptkomponenten in dem gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) amyloide Curli-Fasern und Cellulose bilden (Römling et al., 2013; Flemming et al., 2016; Jenal et al., 2017). Die Synthese von c-di-GMP erfolgt durch Diguanylatzyklasen (DGCs), während der Abbau von spezifischen Phosphodiesterasen (PDEs) bewerkstelligt wird. Kennzeichnend für diese Enzyme sind ihre katalytisch aktiven Domänen. Die Aktivität von DGCs wird über die GGDEF-Domäne vermittelt, in PDEs leistet die EAL-Domäne den Abbau von c-di-GMP. *E. coli* K-12 besitzt 29 GGDEF/EAL-Domänenproteine, von denen 12 DGCs, 13 PDEs und 4 degenerierte Proteine darstellen (Hengge et al., 2015a). Die Kontrolle der enzymatischen Aktivität erfolgt häufig über N-terminale Sensordomänen. Diese sind vielfältig und können somit diverse interne und externe Signale in die c-di-GMP-Signaltransduktion integrieren. Die Untersuchung der CSS-Domäne, einer neuartigen Sensordomäne, die speziell in EAL-Domänen Proteinen zu finden ist, bildet die Grundlage dieser Arbeit.

Fünf (PdeB, PdeC, PdeD, PdeG und PdeN) der 13 PDEs in *E. coli* K-12 besitzen einen identischen Domänenaufbau, bestehend aus einer periplasmatischen Schleife von ca. 200 Aminosäuren, flankiert von je einer Transmembrandomäne und gekoppelt an eine sich im Cyoplasma befindliche EAL-Domäne. Der klassische EHEC O157:H7 kodiert zudem für ein sechstes Protein mit diesem Aufbau (Richter et al., 2014; Hengge et al., 2015a). Der, sonst relativ diverse, periplasmatische Bereich aller dieser PDEs enthält zwei hochkonservierte Cysteine, von denen eines in dem charakteristischen CSS(Cystein-Serin-Serin)-Motiv angeordnet ist.

Cysteine zeichnen sich durch die hohe Reaktivität ihrer Thiolgruppe bei Redoxveränderungen aus. So liegt diese unter reduzierenden Bedingungen frei vor (-SH), während es durch Oxidation zur Bildung einer Disulfidbrücke (-S-S-) kommen kann. Die Bildung einer Disulfidbrücke (DSB) trägt insbesondere im Periplasma zu Stabilität und Funktionalität von Proteinen bei. Das Periplasma ist eine eher oxidierende Umgebung mit einem komplexen System zur Aufrechterhaltung der vorherrschenden Redoxhomöostase. Das DsbA/DsbB-System stabilisiert dabei viele sekretierte Proteine durch die Einführung von Disulfidbrücken, die dabei freiwerdenden Elektronen werden über die Atmungskette abgeleitet. Auf der anderen Seite sorgt das DsbD/DsbC/DsbG-System für die Reduktion fehlerhaft eingefügter DSB durch Elektronen, welche vom Thioredoxin-System bereitgestellt werden (Inaba, 2009). Komplementiert wird das DSB-System im Periplasma

durch diverse Chaperone und Proteasen. In *E. coli* sind vor allem die HtrA-Proteasen DegP und sein Homolog DegQ für die Proteolyse oder Neufaltung fehlgefalteter Proteine verantwortlich (Clausen et al., 2011).

Thiol-Disulfid-Schalter bieten jedoch auch die Möglichkeit der Regulation von Proteinfunktionen. Hierfür sind besonders Transkriptionsfaktoren bekannt, welche auf Redoxstress reagieren und Gene zur Bekämpfung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aktivieren (Hillion and Antelmann, 2015). Auch für CSS-PDEs wäre die Regulation der enzymatischen Aktivität ihrer EAL-Domäne, im Kontext der komplexen Redoxhomöostase des Periplasmas, über einen solchen Schalter denkbar. Am Beispiel von PdeC sollte in dieser Arbeit die Wirkungsweise und physiologische Funktion der potentiell redox-regulierten CSS-PDE aufgeklärt werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob PdeC in aktiver Form zur Regulation der Synthese von Biofilmmatrixkomponenten beiträgt.



### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Materialien

Alle in dieser Arbeit standardmäßig verwendeten Chemikalien und Materialien wurden von den Herstellern AppliChem, Millipore, Merck, Carl Roth, Roche, Sigma-Aldrich und VWR bezogen. Weitere Geräte und Produkte mit Bezugsquellen sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tab. 1: Chemikalien, Materialien und Geräte mit Bezugsquellen

Produkt	Hersteller (Spezifikation)
Acrylamid-Bisacrylamid	Carl Roth
Agarose	Biozym Scientific
Äkta	GE Healthcare
Anti-His Antikörper	Biomol, Bethyl Laboratories
Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase	GE Healthcare
Anti-Rabbit IgG-Alkalische Phosphatase	Sigma Aldrich
Antibiotika (Amp, Cm, Kan, Tet)	Carl Roth, Sigma, Merck
APS	Carl Roth
BCIP	Carl Roth
Blotmembran für Proteine	(Roti-PVDF) Carl Roth
Blotting Apparatur	Bio-Rad, Peqlab
Bromphenol Blau	Carl Roth
c-di-GMP	BIOLOG Life Science Institute
Chloroform	Carl Roth
CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	New England Biolabs
Coomassie Brilliant Blau R-250	AppliChem
DNA-Längenmarker: 100 bp extended	New England Biolabs
DNA-Polymerasen (Opti-Taq, Q5)	Roboklon, New England Biolabs
dNTP-Stammlösungen	MP Biomedicals
Elektroporator	(Gene Pulser Xcell) Bio-Rad
ELISA Reader	(Model 550) Bio-Rad
French Press	(HTU - DIGI-F-Press) G. Heinemann
Gel-Extraction-Kit	Qiagen, New England Biolabs

Geldokumentationsanlage	Biozym
IPTG	Carl Roth
Lysozym	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
NanoDrop	Peqlab
NBT	AppliChem
Oligonukleotide	Metabion
ONPG Carl Roth	Carl Roth
PAGE-Apparatur	Bio-Rad
PCR-Purification / Gel-Extraction Kit	Qiagen, New England Biolabs
PCR-Thermocycler	(Arktik) Thermo Scientific
Phosphorimager	(FLA-2000G) Fujifilm
Photometer	(GeneQuant 100) GE Healthcare
Plasmid-Preparations-Mini-Kit	Analytik Jena
Proteingrößenstandards	New England BioLabs
Restriktionsenzyme	New England BioLabs
T4-DNA Ligase	New England BioLabs
TCA	Carl Roth
TEMED	Carl Roth
Wasserbad-/Luftschüttler	HT Infors AG / New Brunswick
Whatman Gel-Blotting-Papier	Carl Roth
X-Gal	Carl Roth
Zentrifugen	Sorvall Instruments, Eppendorf

## 3.2 Medien und Medienzusätze

### 3.2.1 Flüssigmedien

Zur Sterilisation wurden alle Medien nach der Herstellung autoklaviert. Temperatursensitive Zusätze ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , Glukose,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ) wurden separat durch Filtration sterilisiert und anschließend dazugegeben.

---

<b>LB</b> (Luria-Bertani-Medium)	Bacto Trypton	10 g
	Bacto Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O	1 l

**LBnoS** (LB Medium ohne Salz) wurde ohne die Zugabe von NaCl hergestellt.

<b>YESCA</b> Medium	Casaminosäuren	10 g
	Bacto Hefeextrakt	1 g
	H <sub>2</sub> O	1 l

<b>TB</b> Medium	Bacto Trypton	12 g
	Bacto Hefeextrakt	24 g
	H <sub>2</sub> O	900 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,17 M)	50 ml
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,72 M)	50 ml
	Glukose (80%)	5 ml

<b>SOB</b> Medium	Bacto Trypton	10 g
	Bacto Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,5 g
	H <sub>2</sub> O	1 l

<b>SOC</b> Medium	SOB Medium +	
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	Glukose	20 mM

<b>2xTSS</b> Medium	LB Medium +	
	PEG-6000	20%
	MgSO <sub>4</sub>	100 mM
	DMSO	10%

<b>10xM9</b> Medium (pH 7,4)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	170 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22 mM
	NaCl	8,5 mM
	NH <sub>4</sub> Cl	20 mM

<b>M9</b> Medium (einfach)	10xM9	100 ml
	ddH <sub>2</sub> O	900 ml
	CaCl <sub>2</sub>	0,1 mM
	MgSO <sub>4</sub>	1 mM

### 3.2.2 Festmedien

Die Herstellung von Festmedien erfolgte durch die Zugabe von 18 g (20 g bei YESCA Medium) Span Agar auf 1 l des Flüssigmediums vor dem autoklavieren.

**Kongorot**-Platten wurden unter Zugabe von 20 ml Kongorot-Lösung (sterilfiltriert) auf 1 l Medium hergestellt.

Kongorot-Lösung in 70% Ethanol:	Kongorot	2 mg/ml
	Coomassie- Brilliant Blue	1 mg/ml

### 3.2.3 Medienzusätze

Die Medienzusätze in der folgenden Tabelle wurden in hochkonzentrierten Stammlösungen angesetzt.

Tabelle 2: Verwendete Medienzusätze, deren jeweiliges Lösungsmittel und Endkonzentrationen

Medienzusätze	Lösungsmittel	Stammlösungs-konzentration	Endkonzentration
Ampicillin	H <sub>2</sub> O	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	H <sub>2</sub> O	50 g/ml	50 µg/ml
NaCl	H <sub>2</sub> O	5 M	0,5 M
X-Gal	N,N-Dimethylformamid	10 mg/ml	40 µg/ml

### 3.3 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

#### 3.3.1 Bakterienstämme

Tabelle 3: Liste der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
W3110	E. coli K-12 thyA36 deoC2 IN(rrnD-rrnE)I	(Hayashi et al., 2006)
AR3110	W3110 <i>bcsQ</i> *6L (Cellulose-positiv)	(Serra et al., 2013a)
BL21 (DE3) C41	F – <i>ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm</i> (DE3)	(Miroux and Walker, 1996)
GB1100	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ <i>csgB::lacZ</i> (hybrid)	(Serra et al., 2015)
NS252	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ <i>yaiC::lacZ</i> (hybrid)	(Weber et al., 2006)
NS300	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ <i>pdeC::lacZ</i> (hybrid)	(Sommerfeldt et al., 2009)
AR33	W3110 <i>csgB::scar</i>	(Serra et al., 2013b)
AR92	W3110 <i>pdeC::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR187	AR3110 <i>rpoS::scar</i>	(Serra et al., 2013b)
AR188	AR3110 <i>csgD::scar</i>	(Serra et al., 2013b)
AR190	AR3110 <i>pdeH::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR191	AR3110 <i>dgcM::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR192	AR3110 <i>pdeR::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR193	AR3110 <i>dgcC::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR196	AR3110 <i>pdeD::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR198	AR3110 <i>bcsA::scar csgB::scar</i>	(Serra et al., 2013a)
AR199	AR3110 <i>dgcE::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR200	AR3110 <i>pdeK::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR220	AR3110 <i>pdeN::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR221	AR3110 <i>dgcN::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR222	AR3110 <i>pdeB::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)

AR223	AR3110 <i>pdeG::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR224	AR3110 <i>rflP::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR225	AR3110 <i>cdgl::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR226	AR3110 <i>pdeL::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR227	AR3110 <i>dgcT::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR231	AR3110 <i>pdeI::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR232	AR3110 <i>dgcl::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR233	AR3110 <i>dgcF::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR234	AR3110 <i>dgcP::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR235	AR3110 <i>dgcJ::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR236	AR3110 <i>bluF::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR237	AR3110 <i>pdeO::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR238	AR3110 <i>dgcO::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR239	AR3110 <i>dgcZ::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR240	AR3110 <i>pdeC::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR241	AR3110 <i>pdeA::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR242	AR3110 <i>dgcQ::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR243	AR3110 <i>pdeF::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR244	AR3110 <i>csrD::scar</i>	(Sarenko <i>et al.</i> , 2017)
AR282	AR3110 <i>csgB::scar</i>	(Serra <i>et al.</i> , 2013a)
BS25	AR3110 <i>pdeB::scar pdeN::scar</i>	Diese Arbeit
BS27	AR3110 <i>pdeB::scar pdeN::scar pdeC::scar</i>	Diese Arbeit
BS124	AR3110 <i>dsbD::scar</i>	Diese Arbeit
BS131	AR3110 <i>dsbC::scar</i>	Diese Arbeit
BS138	AR3110 <i>dsbA::scar</i>	Diese Arbeit
BS139	W3110 <i>dsbA::scar</i>	Diese Arbeit
BS142	W3110 <i>pdeC::lacZ soxSR::cm</i>	Diese Arbeit

BS145	W3110 <i>dsbC::kan</i>	Diese Arbeit
BS151	AR3110 <i>dsbB::scar</i>	Diese Arbeit
BS152	W3110 <i>dsbD::kan</i>	Diese Arbeit
BS153	W3110 <i>dsbG::kan</i>	Diese Arbeit
BS186	AR3110 <i>degP::scar</i>	Diese Arbeit
BS187	W3110 <i>degP::scar</i>	Diese Arbeit
BS188	AR3110 <i>pdeB::scar pdeN::scar pdeC::scar pdeG::scar</i>	Diese Arbeit
BS189	AR3110 <i>pdeB::scar pdeN::scar pdeC::scar pdeG::scar pdeD::scar</i>	Diese Arbeit
BS192	AR3110 <i>degQ::kan</i>	Diese Arbeit
BS208	W3110 <i>dsbB::scar</i>	Diese Arbeit
BS214	AR3110 <i>degP::scar degQ::kan</i>	Diese Arbeit
BS216	W3110 <i>degQ::scar</i>	Diese Arbeit
BS217	W3110 <i>degP::scar degQ::scar</i>	Diese Arbeit
BS259	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ <i>csgB::lacZ (hybrid)</i> <i>dsbA::scar</i>	Diese Arbeit
BS262	W3110 $\Delta lac(I-A)$ $\lambda RS45$ <i>csgB::lacZ (hybrid)</i> <i>degQ::scar degP::kan</i>	Diese Arbeit
BS265	AR3110 <i>dsbG::scar</i>	Diese Arbeit

Bei der Bezeichnung “scar” handelt es sich um Mutanten, welche durch Ein-Schritt-Inaktivierung hergestellt wurden und deren entsprechende Antibiotikakassette unter Verwendung des pCP20 Plasmids entfernt wurde. Dabei verbleibt eine etwa 80 bp lange Nukleotidsequenz als Narbe („scar“), welche die FRT-Seiten beinhaltet (Datsenko and Wanner, 2000).

### 3.3.2 Bakteriophagen

Zur Übertragung von chromosomalen Mutationen auf einen Rezipientenstamm wurde der P1<sub>vir</sub> Phage aus der Laborsammlung als transduzierender Phage eingesetzt.

### 3.3.3 Plasmide

Tab. 4: Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pKD46	Helferplasmid mit $\lambda$ -Red-Rekombinase; Arabinose-induzierbarer Promotor ( <i>ParaB-<math>\gamma</math>-<math>\beta</math>-exo</i> ); Temperatur-sensitiv; Amp <sup>R</sup>	(Datsenko and Wanner, 2000)
pCP20	Helferplasmid mit FLP-Rekombinase, hitzeinduzierbarer Promotor, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	
pKD13	Template-Plasmid zur Amplifikation der FRT-flankierten <i>kan</i> -Kassette; <i>pir</i> -abhängiger <i>oriRy</i> ; Amp <sup>R</sup> ; Kan <sup>R</sup>	
pKD3	Template-Plasmid zur Amplifikation der FRT-flankierten <i>cm</i> -Kassette; <i>pir</i> -abhängiger <i>oriRy</i> ; Amp <sup>R</sup> ; Cm <sup>R</sup>	
pCAB18	IPTG-induzierbarer Niedrigkopien-Vektor mit p <sub>tac</sub> -kontrollierter MCS; Amp <sup>R</sup>	(Barembuch and Hengge, 2007)
pTJ9	pCAB18 <i>pdeC::His6</i> EAL ( $\Delta$ AS7-266) nur cytoplasmatische EAL-Domäne	MA Tina Jänicke
pTJ11	pCAB18 <i>pdeC::His6</i> TM2+EAL ( $\Delta$ AS7-234) nur 2. Transmembrandomäne und EAL-Domäne	MA Tina Jänicke
pBS6	pCAB18 <i>pdeC</i>	Diese Arbeit
pBS7	pCAB18 <i>pdeC</i> C106A (CSS-ASS)	Diese Arbeit
pBS8	pCAB18 <i>pdeC</i> E303A (EAL-AAL)	Diese Arbeit
pBS11	pCAB18 <i>pdeC</i> C75A	Diese Arbeit
pBS16	pCAB18 <i>pdeC::His6</i>	Diese Arbeit
pBS17	pCAB18 <i>pdeC::His6</i> C106A (CSS-ASS)	Diese Arbeit
pBS20	pCAB18 <i>pdeC</i> C106A/E303A (ASS/AAL)	Diese Arbeit
pBS21	pCAB18 <i>pdeC::His6</i> C106A/E303A (ASS/AAL)	Diese Arbeit
pBS22	pCAB18 <i>pdeC::His6</i> C75A/C106A	Diese Arbeit



pBS23	pCAB18 <i>pdeC::His6</i> C75A	Diese Arbeit
pBS25	pCAB18 <i>pdeC::His6</i> E303A (EAL-AAL)	Diese Arbeit
pBS27	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> ASS A191F	Diese Arbeit
pBS28	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> ASS V207F	Diese Arbeit
pBS29	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> ASS Q208A	Diese Arbeit
pBS30	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> ASS G211A	Diese Arbeit
pBS31	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> ASS C214A	Diese Arbeit
pBS32	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> ASS A215F	Diese Arbeit
pBS33	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> ASS T216A	Diese Arbeit
pBS34	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> ASS V217A	Diese Arbeit
pBS35	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> ASS Y218A	Diese Arbeit
pBS36	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> ASS K221A	Diese Arbeit
pBS37	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> ASS R222A	Diese Arbeit
pBS38	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> ASS A229F	Diese Arbeit
pBS39	pCAB18 <i>pdeC::His6</i> $\Delta$ AS45-234 (Deletion des periplasmatischen Bereichs von PdeC)	Diese Arbeit
pBS40	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> TM1 LacY (Austausch der 1. Transmembrandomäne von PdeC (AS8-34) gegen den analogen 1. Transmembranbereich aus LacY (AS10-36))	Diese Arbeit
pBS41	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> TM2 LacY (Austausch der 2. Transmembrandomäne von PdeC (AS235-262) gegen den analogen 2. Transmembranbereich aus LacY (AS237-258))	Diese Arbeit
pBS42	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> TM1/TM2 LacY (Austausch beider Transmembrandomänen von PdeC gegen die homologen Bereiche aus LacY)	Diese Arbeit
pBS43	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> C106A TM1 LacY	Diese Arbeit
pBS44	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> C106A TM2 LacY	Diese Arbeit

pBS45	pCAB18 <i>pdeC::HIS6</i> C106A TM1/TM2 LacY	Diese Arbeit
-------	---	--------------

### 3.4 Mikrobiologische Methoden

#### 3.4.1 Sterilisation

Medien und Lösungen wurden unter feuchter Atmosphäre bei einem Druck von 1bar und einer Temperatur von 120°C autoklaviert. Materialien aus Glas wurden 8h bei 180°C trocken sterilisiert. Sterilfiltration erfolgte bei hitzeempfindlichen Lösungen mit Milliporefiltern (Porendurchmesser 0,22 µm oder 0,45 µm).

#### 3.4.2 Kultivierung

Die Bakterien wurden in Flüssigkulturen unter aeroben Bedingungen herangezogen, wobei die verwendeten Glasgefäße nur zu maximal 20% gefüllt wurden, um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr gewährleisten zu können. Die Inkubation erfolgte im Reagenzglasroller oder in Schüttlern (130-300 rpm) bei 28°C oder 37°C. Auf Festmedien kultivierte Bakterienstämme wurden im Brutschrank ebenfalls bei 28°C oder 37°C inkubiert.

#### 3.4.3 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Bestimmung der Zelldichte in einer Flüssigkultur erfolgte unter Zuhilfenahme eines Photometers. Bei der Messung der optischen Dichte wurde eine Wellenlänge von  $\lambda = 578$  nm (OD<sub>578</sub>) am Gerät eingestellt. Um das lineare Verhältnis von Bakterienkonzentration und OD<sub>578</sub> zu gewährleisten, wurde die Kulturprobe mit Medium stets so verdünnt, dass die gemessene OD<sub>578</sub> den Wert 0,5 nicht überstieg. Die Ermittlung des korrekten Wertes der Kultur erfolgte dann unter Einberechnung des Verdünnungsfaktors. Als Referenz diente steriles Medium.

#### 3.4.4 Aufbewahrung von Bakterienstämmen und Bakteriophagenlysaten

Die dauerhafte Aufbewahrung von Bakterienstämmen erfolgte in Kryoröhrchen mit 7% DMSO (Dimethylsulfoxid) bei -80°C, hierzu wurde eine Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes in LB benutzt. Auf Festmedium gewachsene Stämme wurden höchstens eine Woche bei 4°C aufbewahrt. Die Lagerung von Bakteriophagenlysaten erfolgte in Schraubdeckelglasröhrchen bei 4°C und unter Zugabe einiger Tropfen Chloroform.

### 3.4.5 Herstellung eines P1-Lysats

Um ein P1-Lysat herzustellen, wurde zunächst eine 5 ml Übernachtskultur vom Spender-Bakterienstamm angesetzt. Diese Kultur wurde dann im Verhältnis 1:100 in LB verdünnt und im Rollinkubator bei 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von ca. 0,3 herangezogen. Die Lyse der Bakterienzelle erfolgte nach Zugabe von einem Tropfen 1M CaCl<sub>2</sub> und 1-2 Tropfen von einem Wildtyp P1<sub>vir</sub>-Lysat bei 37°C für ca. 3-8 Stunden. Zu der nun klaren Kultur mit deutlich sichtbaren Zelltrümmern, wurden 5-10 Tropfen Chloroform gegeben, um auch noch verbleibende Bakterienzellen völlig abzutöten. Um die Phagen von den Zelltrümmern zu trennen, wurde das Lysat 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles Schraubdeckelglasröhrchen überführt, erneut mit 2-3 Tropfen Chloroform versehen und bei 4°C aufbewahrt.

### 3.4.6 P1-Transduktion

Mit Hilfe einer P1-Transduktion ist es möglich, DNA aus einer Spenderzelle (Donor) in eine Empfängerzelle (Rezipient) durch Verwendung von Bakteriophagen zu transferieren. Dies wird vor allem zur Übertragung von Mutationen einzelner Gene zwischen Bakterienstämmen genutzt (Miller, 1972; Miller, 1992). Hierfür wurde zunächst ein Phagenlysate hergestellt (siehe 3.4.5). Die in dem Lysat befindlichen Phagen enthalten sowohl ihre eigene DNA, sowie auch die DNA des Spenderbakteriums. Wird der Rezipientenstamm mit dem Lysat infiziert, kann die DNA des Donorstammes durch Rekombination in dessen Chromosom integrieren.

Die Infektion erfolgte nach folgendem Protokoll: 5 ml einer Übernachtskultur des Rezipienten wurden bei 5000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend mit 2,5 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert und mit 12,5 µl 1 M CaCl<sub>2</sub> versehen. 200 µl der Zellsuspension versetzt mit 3-5 Tropfen P1 Lysats inkubierten dann für 10 min bei Raumtemperatur. Die Kontrolle erfolgte ohne Verwendung von Lysat. Nach Zugabe von 500 µl LB erfolgte erneut eine Inkubation bei 37°C für 30 min im Rollinkubator. Zum Schluss wurde zu den Ansätzen 1 Tropfen 1 M Natriumcitrat gegeben und auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert.

### 3.4.7 Untersuchung der Biofilmbildung auf Festmedien

Die Anzucht von Biofilmen in Form von Makrokolonien erfolgte auf LB-Medium ohne Salz (LBnoS) oder YESCA-Medium enthaltenden Agarplatten. Das autoklavierte Medium zur Herstellung der Platten kühlte bis etwa 50°C ab, bevor etwaige Zusätze dazugegeben wurden. Für das Makrokolonie-Assay wurden 5 µl einer Übernachtskultur der zu testenden

Stämme auf die zuvor 1-2 Tage bei Raumtemperatur getrockneten Platten getropft. Nach 5-tägiger Inkubation bei 28°C wurden die entstandenen Kolonien mit einem Stereomikroskop (Zeiss) fotografiert. Zur besseren Visualisierung extrazellulärer Matrixkomponenten im Makrokolonie-Biofilm diente Kongorot (Hammar et al., 1995). Dieses wurde zusammen mit Coomassie-Brilliant Blue G in einer 70%igen Ethanol gelöst und mittels Filtration sterilisiert. Auf 1 l Medium erfolgte die Zugabe von 20 ml der Kongorot Lösung.

<b>Kongorot Lösung</b> (100 ml):	Kongorot	200 mg
	Coomassie-Brilliant Blue	100 mg
	Ethanol (unvergällt)	70 ml
	ddH <sub>2</sub> O	30 ml

### 3.4.8 Untersuchung redox-relevanter Umweltbedingungen

Der Einfluss von Licht auf das Wachstum eines Makrokolonie-Biofilms wurde mit einer handelsüblichen Tageslichtlampe (Dennerle Nano Light 11 Watt) untersucht. Für das Makrokolonie-Assay wurden Kongorot Platten mit LBnoS genutzt (siehe Abs. 3.4.7) und 5 Tage bei 28°C konstant der Lichtquelle ausgesetzt, welche ca. 18,5 cm über der Platte angebracht wurde. Kontrollplatten wurden in völliger Dunkelheit unter sonst gleichen Bedingungen inkubiert. Makrokolonien für Immunoblot- oder  $\beta$ -Galaktosidase-Assays wuchsen lediglich 24h auf LBnoS-Medium ohne Kongorot, wurden dann sorgfältig mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte gekratzt und in 1 ml M9-Medium vollständig resuspendiert. Die Bestimmung der OD<sub>578</sub> erfolgte anhand einer 1:20 Verdünnung. Anschließend wurden die Proben weiter behandelt wie in den Abschnitten 3.6.2, 3.6.3 und 3.6.5 beschrieben.

Die Zugabe der oxidativen Reagenzien Paraquat und FeCl<sub>2</sub> erfolgte direkt in 100  $\mu$ l einer Übernachtskultur des zu untersuchenden Stammes. Nach kurzem vortexen wurden 5  $\mu$ l der behandelten Kultur bzw. einer unbehandelten Kontrolle auf YESCA-Agarplatten getropft und 24h oder 5 Tage bei 28°C dunkel inkubiert. Die Stocklösungen mit den Konzentrationen von 100 mM (FeCl<sub>2</sub>) und 10 mM (Paraquat) wurden immer frisch in ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

## 3.5 Molekularbiologische Methoden

### 3.5.1 Isolation von genomischer DNA

Zur Gewinnung genomischer DNA aus E. coli wurden 200  $\mu$ l einer Übernachtskultur abzentrifugiert und das entstandene Pellet in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst. Die Lyse erfolgte durch

fünfminütiges Kochen, erneute Zentrifugation für 5 min im Anschluss trennte die Zelltrümmer von löslichen Bestandteilen. Die Separierung der DNA von den sonstigen Bestandteilen, wie Proteinen, wurde durch die Zugabe von Chlorform gewährleistet. Nach einem finalen Zentrifugationsschritt für 10 min bei mind. 12000 rpm, konnte die wässrige DNA-Phase bei -20°C gelagert und für PCR-Reaktionen verwendet werden.

### 3.5.2 Isolation von Plasmid DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem innuPREP Plasmid Mini Kit von Analytik Jena.

### 3.5.3 Polymerasekettenreaktion

Die durchgeführten Polymerasekettenreaktionen (PCR) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurden in 20 µl oder 50 µl Ansätzen nach dem grundlegenden Protokoll von Sambrook et al. durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Hauptsächlich wurden die Opti-Taq Polymerase von Roboklon, sowie die Q5-Polymerase von New England Biolabs zur Amplifikation verwendet. Die Annealingtemperatur, bei der sich die Primer (Oligonukleotide) an den komplementären Einzelstrang (Template-DNA) anlagern, wurde 3 - 5°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur der Primer gewählt.

Ein Standard PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

1,25 U	DNA-Polymerase
1x	Polymerase Reaktionspuffer
0,3 µM	5'- und 3'- Primer
1-5 µl	Template (chromosomale DNA/ Plasmid-DNA/ Koloniesuspension)
1 mM	dNTPs (MP Biomedicals)
	MilliQ-Wasser
(5 mM	MgCl <sub>2</sub> )

Die PCR-Ansätze wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) bzw. dem Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB) aufgereinigt.

### 3.5.4 Punktspezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt-PCR

Die Realisierung einer zielgerichteten Mutation innerhalb des *pdeC* Gens erfolgte durch eine Zwei-Schritt-PCR unter Verwendung von zwei Primerpaaren. Dabei schloss das erste Paar die zu mutierende Region stromaufwärts und stromabwärts ein und enthielt jeweils eine

Restriktionsschnittstelle zur Klonierung in den gewünschten Vektor. Zwei weitere, zueinander komplementäre Primer, trugen die gewünschte Mutation und umschlossen etwa 20-25 Nukleotide um diesen Bereich. In zwei parallelen PCR-Ansätzen wurde zunächst je ein stromaufwärts bzw. stromabwärts liegender Primer mit je einem Mutationsprimer kombiniert. Mit einem präparativen Agarosegel wurden die überlappenden Fragmente gereinigt und dienten im Verhältnis von 1:1 als Matrize für den finalen PCR-Ansatz. In diesem amplifizierte das erste Primerpaar mit den Restriktionsschnittstellen, das komplette Fragment welches nun die Mutation trug. Auch dieser PCR-Ansatz wurde durch Gelextraktion gereinigt, die Eluate mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in den gewünschten, zuvor ebenfalls verdauten Vektor ligiert.

### 3.5.5 Konstruktion von Niedrigkopie-Plasmiden mit verschiedenen PdeC Derivaten

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden in dem Niedrigkopien-Vektor pCAB18, welcher einen IPTG-induzierbaren *tac* Promotor vor der Multiple Cloning Site (MCS) besitzt, konstruiert (Barembuch and Hengge, 2007). Der C-terminale 6fach Histidin-Tag wurde durch Oligonukleotidprimer innerhalb der PCR an die verschiedenen PdeC Derivate fusioniert (Tab. 5). Der offene Leserahmen von PdeC wurde durch die Verwendung spezifischer Primer bei der PCR-Amplifikation mit einer EcoRI-Schnittstelle vor dem Startkodon und einer HindIII-Schnittstelle nach dem Stopkodon versehen. Nach der Auftrennung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel und der anschließenden Extraktion der DNA (siehe 3.5.7) erfolgte der Restriktionsverdau von DNA und Vektorplasmid mit den entsprechenden Enzymen sowie die Ligation beider Komponenten (siehe 3.5.8 und 3.5.9).

Die Herstellung des Plasmids mit der PdeC-Variante ohne periplasmatische Domäne ( $\Delta$ AS45-234) erfolgte unter Verwendung eines synthetischen DNA Fragments, welches neben der Deletion auch die nötigen Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in den pCAB18 Vektor enthielt.

Zum Austausch der transmembranen Bereiche von PdeC gegen das erste und/oder zweite Transmembransegment von LacY (Abb. 14) wurde ebenfalls ein synthetisch hergestelltes DNA Fragment genutzt (Tab. 7). Dieses *pdeC* Fragment beinhaltete nur den Bereich des Gens bis zur internen EcoRV Schnittstelle und enthielt bereits die Transmembransegmente von LacY (TM1\* und TM2\*). Zur Klonierung einer oder beider ausgetauschter Bereiche in beliebige, bereits vorhandene PdeC-Plasmidderivate, wurden die *pdeC* internen Schnittstellen EagI und EcoRV sowie die Plasmid-eigenen Schnittstellen EcoRI und HindIII genutzt. Die synthetisch hergestellten DNA-Fragmente konnten mittels PCR beliebig oft vervielfacht oder mit einem Histidin-Tag versehen werden.

Tab. 5: Primer zur Klonierung in pCAB18

Name	Sequenz in 5'-3' Richtung
<i>pdeC</i> fwd EcoRI	gacGAATTCatgagtcacgtgcacgacac
<i>pdeC</i> rev HindIII	gacAAGCTTttattgcccgcgcgttaactc
<i>pdeC</i> rev His6 HindIII	gacAAGCTTttagtatggatggatggtgcccgcgcgttaactc
<i>pdeC</i> rev EcoRV	ctgttttGATATCgattattgg
<i>pdeC</i> EAL cyt fwd	gacGAATTCatgagtcgtattcgacaaaactatttatctccc
<i>pdeC</i> TM2+EAL fwd	gacGAATTCatgtcatatcaacgtcttataacccattttat

In Großbuchstaben hervorgehoben sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen

Tab. 6: Primer zur Herstellung von Punktmutationen

Name	Sequenz in 5'-3' Richtung
<i>pdeC</i> CSS-ASS fwd	gataaccattttttaGCctcatcgctgatagc
<i>pdeC</i> CSS-ASS rev	gctatcagcgatgagGCtaaaaaatggttatc
<i>pdeC</i> EAL-AAL fwd	gtatcggcgctgCagcggtgttacgttggc
<i>pdeC</i> EAL-AAL rev	gccaacgtaacaacgctGcagcgccgatac
<i>pdeC</i> C75A fwd	ggggcaagttGCcactccagcccatcaaaagc
<i>pdeC</i> C75A rev	gctttgatgggctggagtGCaactgcccc
<i>pdeC</i> V207F fwd	ggatttaaccTTCaaagaaatggctatttatatg
<i>pdeC</i> V207F rev	catataaatagccatttcttgGAaggtaaatacc
<i>pdeC</i> Q208F fwd	ggatttaaccgtaGCaagaaatggctatttatatg
<i>pdeC</i> Q208F rev	catataaatagccatttcttGctacggtaaatacc
<i>pdeC</i> G211A fwd	ggatttaaccgtacaaagaaatgCctatttatatg
<i>pdeC</i> G211A rev	catataaatagGcatttcttgtacggtaaatacc
<i>pdeC</i> Y214A fwd	gctatttaGCTgacagtttattcgacaaaacg

<i>pdeC</i> Y214A rev	cgttttgtcgaataaaactgtcgcaGCTaaatagc
<i>pdeC</i> A215F fwd	gctatttatatTT C acagttattcgacaaaacg
<i>pdeC</i> A215F rev	cgttttgtcgaataaaactgtGAAatataaatagc
<i>pdeC</i> T216A fwd	gctatttatatgcgGCagttattcgacaaaacg
<i>pdeC</i> T216A rev	cgttttgtcgaataaaactGCcgcatataaatagc
<i>pdeC</i> V217F fwd	gctatttatatgcgacatTtattcgacaaaacg
<i>pdeC</i> V217F rev	cgttttgtcgaataaaaAtgtcgcatataaatagc
<i>pdeC</i> Y218A fwd	gctatttatatgcgacagttGCTtcgacaaaacg
<i>pdeC</i> Y218A rev	cgttttgtcgaaGCaactgtcgcatataaatagc
<i>pdeC</i> K221A fwd	gtttattcgacaGCacgccaattgcagccattg
<i>pdeC</i> K221A rev	caatggctgcaattgggcgtGCTgtcgaataaac
<i>pdeC</i> R222A fwd	gtttattcgacaaaaGCccaattgcagccattg
<i>pdeC</i> R222A rev	caatggctgcaattgggGCTttgtcgaataaac
<i>pdeC</i> A191F fwd	gttaagcaaagagTTctcggcagcaacg
<i>pdeC</i> A191F rev	cggtgctgccgagAActcttgcttaac
<i>pdeC</i> A229F fwd	gcagccattgtTT C actcatatcaacg
<i>pdeC</i> A229F rev	cgttgatatgaagtGAAaacaatggctgc

In Großbuchstaben hervorgehoben sind die jeweils mutierten Nukleotide



Tab. 7: Synthetische hergestellte Fragmente der Firma IDT®

Name	Sequenz in 5'-3' Richtung
PdeC <sup>Δperi</sup>	<p>gacGAATTCatgagtcacgtgcacgacaccaattactggcggtgccgggcattatcttttagt  tctcttcccatcattctttcgctatggattgccttccttgggcaaaatcagaagtgaataatcagctc  cgctctataacccattttataatcatcttattttgcttgcccgccggtatttggggagctctgtctgct  attactctggctacgtattcgacaaaactatttatctcccaaacgtaaattgcaacgcgcctcgaa  aaacatcaactttgtctttattaccagccaataatcgatatcaaaacagaaaaatgtatcggcgct  gaagcgtgttacgttgccctgggtgagcaggggcaaataatgaatccggcagagttattccgct  ggcagaaaaggaggggatgataaacagataactgattatgttatgataatgtcttcgcgcatc  tgggcgattacctggcaacacatgcagatcgctatgtttctattaacctgtcggcctccgatttcat  acgtcacggtgatagcgcgaatcaatcagaaaacagagcaatacgcggtgcgtccgcagca  aattaaattgaagtgactgagcatgcatttctgatgttgacaaaatgacgccgattattctggctt  ccgccaggcaggttacgaagtggcaattgatgatttggattggctacttaacttcgataacctta  aatcattgaatgtcgatattttgaaaatcgacaaatcgttgttgaaacgctgaccaccacaaaa  ccagtcatttgattgcggaacacatcatcgagctggcgcacagcctgggggtaaaaacgatcgc  tgaaggcgtcgaaactgaggagcaggttaactggctgcgcaaacgcggcgtgcgtattgccg  gggatgggtcttgcgaaggcgatgccgccgaggtgttatgcaatggatggagcaattaccgc  cgcgagggttaacgcgcgggcaataaAAGCTTgtc</p>
PdeC TM1*/TM2*	<p>GAATTCatgagtcacgtgcacgacacaactttggatgttcggttattcttttcttttacttttatac  atgggagcctactcccgttttccgatttggtataaatcagaagtgaataatcagctccgaacct  ttgctcaactggcactggataaatccgagctggtcattcgccaggcagatttagtgagcgtatgca  gctgaacgctatcaggggcaagttgcactccagccatcaaaagcgaatgtgaatattattcgt  ggctatctttatattaatgaattgatctatgcccgatgaaccatttttatgctcatcgctgatagcgc  tgtaaacggctatacgattgcacCGGCCGattataagcgtgaacctaacgtttctatctattatt  accgcgatacgccttttctctggctataaaatgacctatatgagcggggaaattatgtggcggt  atcaaccctctctctggagtgaaatgatgtctgatgacccgacattgcaatggggtgtgtatgata  cggtgacgaaaaccttttctcgtaagcaaagaggcctcggcagcaacgttttctccgctgattc  attgaaggatttaaccgtacaaagaaatggctatttatgacaggtttatcgacaaaacgcc  caattgcagccattgttcgactcatatcaacgtggtattatttgccgctatttctgttctcgctatt  attccaaccgctgttggctgctttctgatttcgacaaaactatttatctcccaaacgtaaattgca  acgcgcctcgaaaaacatcaactttgtctttattaccagccaataatcGATATC</p>

In Großbuchstaben hervorgehoben sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen

### 3.5.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Die Geschwindigkeit, mit der die Probe im Gel wandert, hängt von der Länge des Fragments und der Molekülkonformation ab.

Die Konzentration des Agarosegels wurde mit 1% (0,5-5 kb) so gewählt, dass eine optimale Auftrennung der Fragmente erfolgte. Die Proben wurden mit 6x Gel-Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem Größenstandard (100 bp DNA-Marker extended) auf das Agarosegel

aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 80-110 V für ca. 45-60 min. Zum Schluss wurde die DNA für ca. 15-20 min in Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) bzw. GelRed (Genaxxon, 0,001% in H<sub>2</sub>O) angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

**50x TAE Stammlösung**

242 g Tris  
57,1 ml Eisessig  
100 ml 0,5 M EDTA  
mit deionisiertem Wasser auf 1 l auffüllen

**6x Gel-Ladepuffer**

0,25 % Bromphenolblau  
0,25 % Xylencyanol  
30 % Glycerin  
in 1x TAE

### 3.5.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Mit Hilfe eines Skalpells wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (50) von Qiagen bzw. dem Monarch Gel Extraction Kit von NEB aufgereinigt.

### 3.5.8 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen mit Palindromstruktur und schneiden direkt (Typ II-Endonukleasen) in der Sequenz, dabei hinterlassen sie bei einem versetzten Schnitt eine Schnittstelle mit überhängenden Enden (*sticky ends*).

Der Restriktionsverdau zur Klonierung bzw. Plasmidanalyse erfolgte mit Restriktionsendonukleasen von NEB. In einem Restriktionsverdauansatz von 20-50 µl wurden 0,2-1 µg DNA mit ca. 2-8 U Restriktionsenzym pro µg DNA und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verdaut. Der Ansatz wurde für 30-60 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgereinigt.

### 3.5.9 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Methode von Sambrook et al. mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Sambrook et al., 1989).

### 3.5.10 Herstellung elektrokompenter Zellen

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml frischer Übernachtskultur eines Rezipientenstammes beimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>578</sub> = 0,5 - 0,6 bei 37°C inkubiert, in gekühlte Zentrifugationsbecher überführt und 30 min auf Eis gestellt. Die Zentrifugation erfolgte 15 min bei 6000 rpm und 4°C. Das entstandene

Pellet wurde in 80 ml eiskaltem bidestilliertem Wasser aufgenommen und nochmals 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Waschschrift wurde mehrere Mal mit nur noch 8-12 ml bidestilliertem Wasser wiederholt, dann wurde das Pellet mit 2 ml 10 % Glycerin resuspendiert und 1 min bei höchster Umdrehung und 4°C zentrifugiert.

Das nun entstandene Pellet wurde in 1200 µl kaltem 10 % Glycerin gelöst und in 50-100 µl Aliquots aufgeteilt und sofort bei -80°C eingefroren. Alle Schritte sollten auf Eis durchgeführt und alle Materialien vorgekühlt werden.

### 3.5.11 Elektrotransformation

Bei der Elektrotransformation (Elektroporation) handelt es sich um eine Transformationsmethode, bei der sehr hohe Ausbeuten erzielt werden können (Calvin and Hanawalt, 1988). Hierbei wurden üblicherweise 50 µl elektrokompenter Zellen (siehe 3.4.6.2) auf Eis aufgetaut und anschließend 1-2 µl DNA (Ligationsprodukt) dazugegeben. Nach der Überführung des Ansatzes in eine Elektroporationsküvette (BioRad, 0,2 cm) erfolgte die Elektroporation bei 2500 V, 25 µF und 200 Ω für etwa 3-5 sec. Die so behandelte Zellsuspension wurde dann in 1 ml LB-Medium überführt und für 1h bei 37°C im Rollinkubator geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde anschließend auf eine entsprechende Selektionsplatte ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 3.5.12 TSS-Transformation

Die Übertragung von gereinigten Plasmiden in den Rezipientenstamm erfolgte mit Hilfe der TSS-Transformation (Chung et al., 1989). Durch diese Methode erhält man im ausreichenden Maß Transformanten, jedoch nur bei der Verwendung von Plasmid-DNA. Bei Ligationsansätzen reicht die Effizienz des Verfahrens nicht aus.

Für einen TSS-Transformationsansatz wurden 200 µl einer Bakteriensuspension des Rezipientenstammes, welcher sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand, mit 200 µl gekühltem 2x TSS und 0,5- 2 µl Plasmid DNA versetzt. Die Transformationsansätze wurden zusätzlich mit einem Kontrollansatz ohne DNA für 20 min auf Eis inkubiert und danach 1 h im Rollinkubator geschüttelt. Die Selektion erfolgte durch Ausplattierung auf den entsprechenden LB-Platten über Nacht bei 37°C.

#### **2x TSS**

20 %	PEG-6000	
10 %	DMSO	(Zugabe nach dem Autoklavieren)
10 mM	MgSO <sub>4</sub>	(Zugabe nach dem Autoklavieren)

in LB-Medium

### 3.5.13 Erzeugung chromosomaler Knockout-Mutanten durch Ein-Schritt-Inaktivierung

Die Inaktivierung chromosomaler Gene zur Herstellung von Knockout-Mutanten erfolgte mit Hilfe der Methode von Datsenko und Wanner (Datsenko and Wanner, 2000). Hierbei wurden PCR-Fragmente welche für eine Kanamycin (pKD13)- oder Chloramphenicol(pKD3)-Resistenzkassette kodierten, durch das  $\lambda$ -Red-Rekombinase-System in das Genom von *E. coli* inseriert. Die Amplifikation der Resistenzkassette erfolgte mit Primern, die einerseits eine 40-50 bp lange Homologiesequenz zum Start- und Stopbereich des zu deletierenden Gens aufwiesen (H1 und H2) und andererseits aus 20 bp bestanden, welche der Verfielfältigung der Antibiotikakassette dienten und Homolog zum genutzten pKD13 (P1 und P4) oder pKD3 (P1 und P2) Plasmid waren. Die durch Gelextraktion gereinigten PCR-Fragmente wurden in elektrokompente Zellen transformiert, die das induzierte Helferplasmid pKD46 trugen und demnach das  $\lambda$ -Red-Rekombinase-System bereits exprimierten. Die Selektion erfolgte auf Antibiotika-haltigen LB-Platten bei 37°C und sorgte für die Identifikation der richtigen Klone. Außerdem führte dieser Schritt zum Verlust des Temperatur-sensitiven pKD46 Plasmids und der damit verbundene Ampicillin-Resistenz. Mittels PCR wurde zusätzlich die korrekte Insertion der Antibiotika-Kassette in das Chromosom von *E. coli* überprüft. Um mögliche Mutationen durch das Rekombinase-System während der Klonierung auszuschließen, wurde ein P1-Lysat aus dem generierten Stamm gezogen und mit diesem ein neuer *E. coli* K-12 Stamm transduziert. Mit diesem Lysat konnte die spezifische Mutation zudem in weitere Stämme von Interesse übertragen werden. Nötigenfalls wurde die Resistenzkassette unter Zuhilfenahme des Temperatur-sensitiven pCP20 Plasmids entfernt. Dieses kodiert eine FLP-Rekombinase, die mit den FRT-Bereichen welche die Antibiotikakassette flankieren interagiert.

Tab. 8: Primer zur Herstellung und Kontrolle chromosomaler Knockout-Mutanten

Name	Sequenz in 5' - 3' Richtung
OSI <i>dsbA</i> H1P1	<b>gagtagatcatgaaaaagatttgctggcgctggctggttgttttagcgtgtaggctggagctgcttc</b>
OSI <i>dsbA</i> H2P4	<b>gaatattcacgggctttatgtaatttacattgaattattttctcattccggggatccgtcgacc</b>
<i>dsbA</i> T1	<b>ccgagcagcgatgcaactg</b>

<i>dsbA</i> T2	cgacaccaggctgaatttgcg
OSI <i>dsbB</i> H1P1	ggtttaaactgcgcactctatgcatattgcagggaatgattatgttgcg <b>gtgtaggctggagctgcttc</b>
OSI <i>dsbB</i> H2P4	gcggcaggaaaaaagcgctcccgaggagcgccgaatggattagcgacc <b>attccggggatccgctcgacc</b>
<i>dsbB</i> T1	cttatggccgcatggtgtggatg
<i>dsbB</i> T2	gatgctgggggatttctcagtc
OSI <i>dsbC</i> H1P1	cacccgcgggcgtgatgtctgaaaagaacgggaagatttatgaagaaagg <b>gtgtaggctggagctgcttc</b>
OSI <i>dsbC</i> H2P4	gacttcacggcgacgaagttgtatctgttgcacgcaattattacc <b>attccggggatccgtcgacc</b>
<i>dsbC</i> T1	cagatgacgcgacagaccttc
<i>dsbC</i> T2	gcacgcttagagccgtgctg
OSI <i>dsbD</i> H1P1	cacggagacacagattacctctcatggctcaacgcacatcttacgctgac <b>gtgtaggctggagctgcttc</b>
OSI <i>dsbD</i> H2P4	cacgttgacgctattttcctccgtctttccactgcaagtgctgttca <b>attccggggatccgtcgacc</b>
<i>dsbD</i> T1	ctatgtacggcaccagatgaag
<i>dsbD</i> T2	gcttttgttcggcggttgcg
OSI <i>dsbG</i> H1P1	cagtgataggttatgccttttactcgacttttgactgactgaaaaggac <b>gtgtaggctggagctgcttc</b>
OSI <i>dsbG</i> H2P4	cttttattattccccataatgatattaagcgttttctgatcgggcaacc <b>attccggggatccgtcgacc</b>
<i>dsbG</i> T1	ccttcgtaagacaactttgtg
<i>dsbG</i> T2	ctggtaaatacactcaaatatg
OSI <i>degP</i> H1P1	gaagaacacagcaattttgcgttatctgttaatcgagactgaaatacatg <b>gtgtaggctggagctgcttc</b>
OSI <i>degP</i> H2P4	gtaaggagaacccctcccgttttcaggaaggggtgagggagattactg <b>attccggggatccgtcgacc</b>
<i>degP</i> T1	gtatgaccgacctctatgcg

<i>degP</i> T2	gatgatgcgcacgtgtacgtgc
OSI <i>degQ</i> H1P1	ctgttttgaatctcttttctatcattcaggtacgagagcaggaataatg <b>gtgtaggctggagctgcttc</b>
OSI <i>degQ</i> H2P4	cggacatcacacgtaagcctgatgcccggttacgacattaacgcacag <b>attccggggatccgtcgacc</b>
<i>degQ</i> T1	gaagccagcaacgatcagg
<i>degQ</i> T2	gctggcaggcgtctcatcg
OSI <i>soxS-R</i> H1P1	ctgggagtgcgatcaaactgccgacggaaaacgcgggagaaggctgctgcg <b>gtgtaggctggagctgcttc</b>
OSI <i>soxS-R</i> H2P2	gttacgcaacgggcaatcactgcgcgaaaggcagccacaaccaatacat <b>ccatataataatcctccttag</b>
<i>soxS-R</i> T1	gatggttctttgcgaaggc
<i>soxS-R</i> T2	gaagaaacgtcggtagacatac

Fett hervorgehoben sind die homologen Regionen zu dem pKD13 oder pKD3 Plasmid

Die Herstellung aller anderen in Tabelle 3 erwähnten Deletionsmutanten erfolgte unter Verwendung bereits veröffentlichten Oligonukleotide (Weber et al., 2006; Pesavento et al., 2008; Sommerfeldt et al., 2009; Serra et al., 2013a).

Tab. 9: Sonstige Primer

Name	Sequenz in 5'-3' Richtung	Verwendung
k1	cagtcacatagccgaatagcct	Interner Testprimer der Kan-Kassette für OSI
k2	cggcgcctgaatgaactgc	
c1	ttatacgcaaggcgacaagg	Interner Testprimer der Cm-Kassette für OSI
c2	gatcttcggtcacaggtagg	
pTI2-1-1	ggcaaatattctgaaatgagc	Testprimer für pCAB18
pTI2-1-2	cggttcacttctgagttcg	

### 3.5.14 Erzeugung chromosomaler *lacZ*-Reporterfusionen

Die in dieser Arbeit verwendeten chromosomalen *lacZ*-Reporterfusionen sind bereits veröffentlicht und wurden folgendermaßen hergestellt (Sommerfeldt et al., 2009). Zur Amplifikation der ausgewählten Genregion wurde chromosomale DNA von *E. coli* als Matritze („*template*“) eingesetzt. Die ausgewählte Genregion umfasste dabei etwa 300 bp in 5'-Richtung des Translationsstarts und vier bis zehn Codons innerhalb der kodierenden Region des entsprechenden Gens. Für diese PCR wurden die Primer so konstruiert, dass am 5'-Ende des Amplikons ein DNA-Fragment in den *lacZ*-Fusionsvektor pJL28 kloniert wurde (Lucht et al., 1994). Die korrekte Insertion des DNA-Fragmentes wurde durch Sequenzierung ermittelt. Anschließend konnte die *lacZ*-Fusion in das Chromosom von *Escherichia coli* gekreuzt werden. Hierzu wurden die plasmidkodierte Fusionsprodukte durch Rekombination auf den Phagen  $\lambda$ RS45 bzw.  $\lambda$ RS74 übertragen (Simons et al., 1987). Bei dem Prinzip des Transfers handelt es sich um eine doppelt homologe Rekombination der Gene *lacZ* und *bla* (kodiert für  $\beta$ -Lactamase) des Phagen, mit den auf dem Fusionsplasmid divergent orientierten Genen *lacZ* und *bla*. Die stabile Kreuzung in das Chromosom des *E. coli* Stammes GB1000 erfolgte an der att( $\lambda$ )-site. Um eine Mehrfachintegration des  $\lambda$ -Phagen zu verhindern, wurden die Klone durch einen PCR-Test auf Einzellysogenie untersucht (Powell et al., 1994; Simons et al., 1987). Um sicher zu stellen, dass eine Integration der korrekten Fusion stattgefunden hat, wurde eine zusätzliche Kontrolle mittels PCR durchgeführt. Hierbei wurde ein 5'-bindender Primer des jeweiligen Gens, der auch zur Klonierung eingesetzt wurde und ein 3'-Primer, der innerhalb des *lacZ*-Gens bindet verwendet.

## 3.6 Biochemische Methoden

### 3.6.1 Zellfraktionierung

Die Trennung zellulärer Extrakte in die lösliche und Membran-assoziierte Fraktion gelang durch die Behandlung mit NaOH nach dem Protokoll von Russel und Model (Russel and Model, 1982). Hierzu wurden 200  $\mu$ l Zellen aus einer, bei 28°C gewachsenen Übernachtskultur, mit 1 ml 0,1 M NaOH versetzt. Dieses wurde immer kurz vorher frisch aus einem 10 M Stock auf Eis angesetzt. Nach der Zugabe ebenfalls auf Eis, erfolgte sofort die Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4°C. Der Überstand, in dem sich nun die lösliche Zellfraktion befand, wurde vorsichtig abpipettiert in eines neues Eppendorfgefäß überführt und mit 100  $\mu$ l 100%igem TCA behandelt. Zu dem verbliebenen Pellet wurde 1 ml 10% TCA gegeben und sorgfältig resuspendiert. 200  $\mu$ l einer unbehandelten Kontrolle

wurden ebenfalls abezentrifugiert und das Pellet mit 1 ml 10% TCA versetzt. Die Präzipitation erfolgte 20 min lang auf Eis. Anschließend wurde erneut 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Unter dem Abzug wurde die Probe getrocknet um zu gewährleisten, dass alle Acetonreste verdampfen. Die mit NaOH behandelten Proben wurden in 20 µl 1xSB gelöst, die unbehandelten in 40 µl. In der Regel wurden je 20 µl der Proben zur Analyse auf ein 12%iges SDS-Gel geladen.

### 3.6.2 $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest

Mit einer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung kann der Grad der Expression eines Gens als *lacZ*-Fusion bestimmt werden (Miller, 1972). Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde also nach Miller (1972 und 1992) bestimmt und in µmol gespaltenes Substrat (o-Nitrophenol- $\beta$ -D-Galaktopyranosid, ONPG) pro Minute und mg Zellprotein angegeben. Abweichend vom Protokoll wurde die optische Dichte der Zellsuspension bei  $\lambda = 578$  nm und die Extinktion des Produktes o-Nitrophenol bei 415 nm gemessen.

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde zu bestimmten Zeitpunkten je 1 ml Zellsuspension aus der Flüssigkultur entnommen und für 10 min bei 13000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung weggefroren. Für den  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest wurde das Zellpellet in 1 ml Z-Puffer resuspendiert. Eine geeignete Teilmenge wurde dann in einem Endvolumen von 1 ml Z-Puffer verdünnt und für den Assay eingesetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch die Zugabe von je 2 Tropfen 0,1 % SDS und Chloroform. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl ONPG (4 mg/ml) gestartet. Bei Erreichen einer geeigneten Gelbfärbung bzw. nach maximal 1 h wurde die Reaktion mit 500 µl 1M Natriumcarbonat abgestoppt. Die Reaktionsansätze wurden 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 333 µl des Überstandes in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und die Absorption in einem ELISA Reader Model 550 (BioRad) bei  $\lambda = 415$  nm gemessen. Als Referenz diente ein Kontrollansatz, der anstelle der Bakteriensuspension ausschließlich Z-Puffer enthielt.

### 3.6.3 Überexpression und Isolation von löslichen Proteinen

Die Überexpression der löslichen EAL-Domäne von PdeC erfolgte mithilfe des in Abschnitt 3.5.5 beschriebenen, mit C-terminalem Histidin-*Tag* versehenen PdeC EAL-Konstrukts in pCAB18. Dabei wurde das Plasmid durch Elektrottransformation in den Stamm BL21 (DE3) gebracht. Die Bakterien wurden in 1 l nährstoffreichem SOC-Medium mit Ampicillin in einem



Verhältnis von 1:50 angeimpft und bis zu einer  $OD_{578}$  von 0,5-1 bei 37°C herangezogen, bevor die Expression des PdeC EAL ORFs auf dem Plasmid durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert wurde. Nach der Induktion erfolgte eine Herabsenkung der Temperatur auf 28°C bei der die Kulturen weitere 4 h inkubierten. Nach der Zentrifugation wurde das geerntete Zellpellet mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die Aufreinigung des Proteins durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde das Zellpellet mit mindestens 20 ml Lysispuffer versehen, welchem zuvor 2 Tabletten cOmplete™ Mini EDTA-freier Proteaseinhibitorcocktail (Roche) zugegeben wurde und bei 4°C aufgetaut. Der Zellaufschluss erfolgte mittels FrenchPress, wobei 2-3 Durchgänge mit 18000 psi in einer Zelle mit der Kapazität von max. 35 ml den Aufschluss gewährleisteten. Die Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden anschließend durch 40minütige Zentrifugation bei 18000 rpm und 4°C (Sorvall Lynx 4000, Thermo Fisher) sedimentiert. Der Überstand wurde dann mit zuvor in Waschpuffer äquilibrierter Ni-NTA Sepharose (IBA) über Nacht ebenfalls bei 4°C inkubiert. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen wurde das Protein-Matrix-Gemisch auf eine Säule gegeben und mit Imidazolhaltigem Waschpuffer frisch mit Proteaseinhibitortabletten versetzt (1 auf 300 ml) und solange gereinigt bis nahezu kein Protein mehr in der Waschfraktion zu detektieren war ( $OD_{280nm} < 0,03$ ). Die Elution erfolgte durch Zugabe von 4 ml Elutionspuffer, welcher 60 min in der geschlossenen Säule mit dem Protein-Matrix-Gemisch inkubierte. Die Eluate wurden anschließend in 500 µl Schritten aufgefangen und deren Qualität über ein SDS-Gel geprüft. Die Größenausschluss-Chromatographie im Anschluss sorgte nochmals für eine Reinigung des Proteinfragments und das Umpuffern in den Lagerungspuffer (siehe Abschnitt 3.6.8). Die Konzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden mithilfe des LMW-Markers bestimmt (siehe Abschnitt 3.6.6). Nach dem Schockfrieren in flüssigem Stickstoff konnten die Protein-Aliquots bei -80°C gelagert werden.

#### **Lysispuffer**

50 mM	Tris-HCl (pH 8)
300 mM	NaCl
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	Imidazol

#### **Waschpuffer**

50 mM	Tris-HCl (pH 8)
400 mM	NaCl
10 %	Glycerin
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
20 mM	Imidazol

#### **Elutionspuffer**

50 mM	Tris-HCl (pH 8)
400 mM	NaCl

---

10 %	Glycerin
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
250 mM	Imidazol

### 3.6.4 Überexpression und Isolation von Membranproteinen

Die Überproduktion von wildtypischem PdeC Protein mit seinen zwei Transmembrandomänen sowie der PdeC<sup>ASS</sup>-Variante und des TM2+EAL-Konstruktes erfolgte unter Verwendung des *E. coli* Stammes BL21 DE3 (C41). Dabei wurden auch hier die auf pCAB18 befindlichen und somit IPTG-induzierbaren PdeC-Varianten mit C-terminalem 6fach Histidin-*Tag* genutzt (siehe Abschnitt 3.5.5). Den Überexpressionsstamm BL21 DE3 (C41) kennzeichnet eine hohe Toleranz gegen über der Expression von toxischen Proteinen durch eine selektierte, jedoch unbekannte Mutation. Hinzu kommt, dass dem Grundstamm BL21 DE3 die Proteasen OmpT und Lon fehlen was sich ebenfalls positiv auf die Ausbeute überproduzierter Proteine auswirkt (Miroux & Walker, 1996). Die Anzucht in 1,5 l TB-Medium mit Ampicillin bei 37°C erfolgte mit 15 ml ÜN-Flüssigkultur (1:100). Bei einer OD = 0,5-1 wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und die Kultur für weitere 4h bei 37°C inkubiert. Geerntet wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C für 12 min.

Für die Aufreinigung des Proteins durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde das Zellpellet mit mindestens 20 ml Resuspensionspuffer versehen und bei 4°C auf Eis aufgetaut. Der Zellaufschluss erfolgte mittels FrenchPress, wobei 2-3 Durchgänge mit 18000 psi in einer Zelle mit der Kapazität von max. 35 ml den Aufschluss gewährleisteten. Die Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenen Zellen wurden anschließend durch 20minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C (5810R, Eppendorf) sedimentiert. Das pelletieren der Membranen im Überstand erfolgte im Anschluss durch Ultra-Zentrifugation für 1,5 h bei 36000 rpm und 4°C (Sorvall WX Ultra 80, Thermo Fisher). Das Membranpellet wurde mit jeweils 10 ml Solubilisierungspuffer versetzt, aus dem Zentrifugenröhrchen gelöst und in einem Potter homogenisiert. Nach der Zugabe weiterer 10 ml Solubilisierungspuffer mit 4 % Detergenz (DDM - Dodecyl-β-D-Maltosid) und 1 Tablette cOmplete™ Mini EDTA-freier Proteaseinhibitorcocktail (Roche) erfolgte eine 2stündige Inkubation unter ständigem Rühren. Nichtsolubilisiertes Material wurde mittels Ultra-Zentrifugation für 50 min bei 36000 rpm und 4°C entfernt und der Überstand, in zuvor mit Waschpuffer äquilibrierter Ni-NTA Sepharose (IBA), über Nacht ebenfalls bei 4°C inkubiert. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen wurde das Protein-Matrix-Gemisch auf eine Säule gegeben und mit Waschpuffern, welche steigende Konzentrationen Imidazol enthielten und frisch mit Proteaseinhibitortabletten versetzt (1 auf 300 ml) wurden, solange gereinigt bis nahezu kein

Protein mehr in der Waschfraktion zu detektieren war ( $OD_{280nm} < 0,03$ ). Die Elution erfolgte durch Zugabe von 2,5 ml Elutionspuffer, welcher 60 min bei 4°C in der geschlossenen Säule mit dem Protein-Matrix-Gemisch inkubierte. Die Eluate wurden in 500 µl Aliquots aufgefangen und anhand eines SDS-Gels die Aufreinigung überprüft. Die Größenausschluss-Chromatographie im Anschluss sorgte nochmals für eine Reinigung der Proteinfragmente und das Umpuffern in den Imidazol-freien Pufferstock mit 0,05 % DDM und 5 % Glycerin (siehe Abschnitt 3.6.8 und). Für die Weiterverwendung in Nanodiscs wurde das komplette Eluat aufgefangen und zur Entfernung des Imidazols in den Pufferstock mit 5 % Glycerin und 0,05 % DDM umgepuffert (siehe Abschnitt 3.6.8). Die Konzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden mithilfe des LMW-Markers bestimmt (siehe Abschnitt 3.6.6). Waren diese für weitere Verwendungen zu gering, erfolgte eine Ankonzentrierung der Proteinlösung (siehe Abschnitt 3.6.7). Nach dem Schockfrieren in flüssigem Stickstoff konnten die Protein-Aliquots bei -80°C gelagert werden.

**Pufferstock**

50 mM	Tris-HCl (pH 8)
300 mM	NaCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>

**Resuspensionspuffer**

20 ml Pufferstock +

1 Tablette cOmplete™ Mini EDTA-freier Proteaseinhibitorcocktail (Roche)

**Solubilisierungspuffer**

Pufferstock +

5 %	Glycerin
20 mM	Imidazol
2 %	DDM

1 Tablette cOmplete™ Mini EDTA-freier Proteaseinhibitorcocktail (Roche) in 20 ml

**Waschpuffer 1 (2)**

Pufferstock +

5 %	Glycerin
10 mM (20 mM)	Imidazol
0,05 %	DDM

1 Tablette cOmplete™ Mini EDTA-freier Proteaseinhibitorcocktail (Roche) in 200 ml

**Elutionspuffer**

Pufferstock +

250 mM Imidazol

0,05 % DDM

**3.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)**

Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht unter Verwendung von Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Diese setzten sich wie in Tabelle 10 aufgeführt zusammen. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte durch Fällung mit einer finalen Konzentration von 10% TCA. Nach einem Waschschrift mit kaltem Aceton, trockneten die Proben etwa 30 min und wurden anschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt, welcher 400 mM DTT (Dithiothreitol) enthielt. Die Auftrennung zur Visualisierung des PdeC-Proteins erfolgte ohne Zugabe des Reduktionsmittels DTT in den Probenpuffer. Direkt vor dem auftragen auf das Acrylamidgel wurden die Proteinproben 10 min bei 95°C erhitzt, das Membranprotein PdeC inkubierte zuvor zusätzlich 10 min bei 70°C. Die Auftrennung über die SDS-PAGE erfolgte bei 25 mA pro Gel (5x10 cm) für 60 min. Der Lauf mehrerer oder größerer Gele wurde entsprechend bei höheren Stromstärken durchgeführt, wobei die elektrische Spannung beim Start ein Maximum von 120 V nicht übersteigen sollte.

**4x Probenpuffer**

Tris-HCl pH 6.8 (AppliChem) 240 mM

SDS-Lösung (AppliChem) 8%

Glycerin 40%

Bromphenolblau 0,02%

**SDS-PAGE-Puffer**

Tris-HCl 25 mM

Glycerin 190 mM

SDS 0,1%

Tab. 10: Zusammenstellung der Lösungen für Sammel- und Trenngel

2 Gele (5x10 cm)	Sammelgel	Trenngel
Acrylamidkonzentration	4%	12%
Trenngelpuffer (Tris-HCl pH 8.8; 0,4% SDS)		2,5 ml
Sammelgelpuffer (Tris-HCl pH 6.8; 0,8% SDS)	1,25 ml	
Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30)	0,65 ml	4 ml
H <sub>2</sub> O	3,07 ml	3,54 ml
10% Ammoniumpersulfat (APS)	50 µl	70 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	10 µl	20 µl

### 3.6.6 Umpuffern von Proteinlösungen

Das Umpuffern von Proteinlösungen gelang unter Zuhilfenahme der PD10-Entsalzungssäulen der Firma GE Healthcare. Dieses System bietet durch Größenausschluss die Möglichkeit kleinere Moleküle und Salze von der eigentlichen Proteinlösung abzutrennen. Dabei wurde nach dem vorliegenden Protokoll das Prinzip der Gravitation genutzt.

### 3.6.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Anfärbung von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel erfolgte durch kurzes Aufkochen in einer Coomassie-Färbelösung mit anschließender 10minütiger Inkubation unter leichtem Schütteln. Zum Entfärben des Gels wurde 10%ige Essigsäure verwendet. Die Quantifizierung von Proteinbanden in dem Coomassie-gefärbten Gel fand unter Verwendung des Low Molecular Weight Markers (LMW; GE Healthcare) als Standard und der Image Quant TL 8.1 Software statt. Dabei beinhaltete der LMW-Marker, nach entsprechender Verdünnung in 415 µl Probenpuffer, in einem µl definierte Konzentrationen folgender Proteine verschiedener Größen: 160 ng Phosphorylase B (97 kDa); 200 ng Albumin (66 kDa); 350 ng Ovalbumin (45 kDa); 200 ng Carbonanhydrase (30 kDa); 190 ng Trypsininhibitor (20 kDa); 280 ng  $\alpha$ -Lactalbumin (14,4 kDa).

<b>Coomassie-Färbelösung:</b>	Isopropanol	25%
	Essigsäure	10%
	Coomassie Brilliant Blue G	0,05%

### 3.6.8 Erhöhung der Proteinkonzentration

Die Ankonzentration von Proteinlösungen erfolgte mithilfe von Amicon® Ultra-Zentrifugalröhrchen (15 ml, Merck). Die Ausschlussgrößen beliefen sich dabei auf 30 kDa für das vollständige PdeC-Protein und 10 kDa für die TM2+EAL-Domäne sowie die lösliche EAL-Domäne von PdeC.

### 3.6.9 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Größenausschluss-Chromatographie oder auch Gelfiltration wird zur Auftrennung von Biomolekülen nach ihrer Größe verwendet. Dabei wandern kleine Moleküle langsamer als große durch die Gelmatrix, da sie in die Poren der Matrixpartikel eindringen können, was zu längeren Laufstrecken und einer längeren Retentionszeit führt. Zur Trennung, des durch

Proteolyse entstandenen PdeC-Fragmentes von dem vollständigen Protein, sowie zur Reinigung weiterer PdeC-Proteinderivate wurde die Chromatographie-Anlage Äkta Pure 25 L (GE Healthcare) mit der Superdex 200 Increase 10/300 GL Säule genutzt. Bevor 500 µl des Proteins in die Probenschleife geladen werden konnten, erfolgte ein Spülvorgang mit destilliertem Wasser sowie die Äquilibration des Systems mit zwei Bettvolumen des Basispuffers, welcher 0,05% DDM enthielt (siehe 3.6.4). Die Trennung wurde bei einer Flussrate von 0,5 ml/min durchgeführt und die Eluate in 500 µl Fraktionen gesammelt. Nach Abschluss der Trennung wurde die Säule und das gesamte System mit destilliertem Wasser gespült, bei längeren Ruhezeiten der Anlage erfolgte ein weiterer Spülgang mit 20% Ethanol. Die Überprüfung der Fraktionen und die Konzentrationsbestimmung fand unter Verwendung eines Coomassie-gefärbten SDS-Gels statt (siehe 3.6.6). Wenn notwendig wurde die Konzentration der Proteinfraction erhöht (siehe 3.6.7), bevor diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden konnten.

### 3.6.10 Immunoblotanalyse (Western-Blot)

Zur spezifischen Detektion wurden, die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel (siehe Abschnitt 3.6.5), auf eine PVDF-Membran (Roth) übertragen. In dieser Arbeit wurde zur Detektion der PdeC-Derivate am C-terminus des Proteins ein 6fach Histidin-*Tag* angefügt der mithilfe eines spezifischen Antikörpers (Anti-His-*Tag*, Biomol) erkannt werden konnte. Die Detektion des CsgD-Proteins erfolgte mit einem Antikörper, welcher aus gereinigtem CsgD-Protein mit Histidin-*Tag* generiert wurde und demnach spezifisch an das CsgD-Protein bindet, jedoch auch Histidin-markierte Proteine erkennt. Die Sichtbarmachung der Proteine gelang zum einen durch eine Farbreaktion bei der an den sekundären Antikörper gebundene Alkalische Phosphatase die Umsetzung von BCIP und NBT zu einem sichtbaren Farbstoff katalysiert. Eine sensitivere Methode ist zum anderen die Chemilumineszenzreaktion welche ebenfalls angewendet wurde. Hier ist das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP-horseradishperoxidase) an den sekundären Antikörper gekoppelt und katalysiert die Oxidation von Luminol zu einem Reagenz welches Licht emittiert wenn es zerfällt. Lage und Menge an emittiertem Licht korreliert mit Lage und Menge des Proteins und kann über ein Kamerasystem (ImageQuant LAS 400, GE Healthcare) detektiert werden.

#### Transblotpuffer

Tris-HCl pH 7.5	25 mM
Glycerin	192 mM
Ethanol	20 %

#### TBST-Puffer

Tris-HCl pH 7.5	20 mM
NaCl	100mM
Tween 20	0,05 %

**TBSTM**

TBST-Puffer mit 5 % Magermilchpulver

**AP-Puffer**

Tris-HCl pH 9.5      100 mM

NaCl      100 mM

MgCl<sub>2</sub>      5 mM**3.6.11      Inkorporation von Proteinen in Nanodiscs**

Nanodiscs bestehen aus einer nicht-kovalent verbundenen Phospholipid-Doppelschicht, welche durch zwei amphipathische Gürtel-Lipoproteine (MSP; membrane sccaffold protein) zusammengehalten wird und im Inneren das rekonstituierte Membranprotein beherbergen (Catoire *et al.*, 2014). Der Durchmesser der scheibenförmigen Nanodisc kann über die MSPs variiert werden. Hierzu werden der Originalsequenz des Proteins, welche auf dem humanen Apolipoprotein ApoA1 basiert, durch genetische Modifikation Helices hinzugefügt oder entfernt (Ritchie *et al.*, 2009; Borch & Hamann, 2009). In dieser Arbeit wurde das Gürtelprotein MSP1D1 verwendet, womit ein Durchmesser von 98 Å bei einer Lipidfläche von 4400 Å<sup>2</sup> erreicht werden konnte (Bayburt & Sligar, 2010). Dieses wurde freundlicherweise von Anja Richter (AG Prof. Dr. Tolker-Nielsen) zur Verfügung gestellt.

Die Nanodiscs wurden in einem molaren Verhältnis der Komponenten Protein:MSP:Lipid von 1:3:1000 hergestellt. Dabei wurden zunächst ausreichende Mengen Lipid (*E. coli* total lipid extract; 25 mg gelöst in 1 ml Chloroform, Avanti) im Rotationsverdampfer für ca. 30 min getrocknet und anschließend das Gewicht und die daraus resultierende Lipidmenge genau ermittelt. Im Ultraschallbad wurde das Lipid für 1-5 min in dem entsprechenden Volumen Nanodisc-Puffer, welcher 10 % DDM enthielt, gelöst. Nach der Zugabe von solubilisiertem Membranprotein und Gürtelprotein wurde das Gemisch mit Stickstoffgas überschichtet und für eine Stunde bei 4°C rollend inkubiert. Die eingesetzten Volumina und Stoffmengen zur Herstellung von Nanodiscs, welche das wildtypische PdeC Protein oder die PdeC TM2+EAL-Variante enthielten, können Tabelle 11 entnommen werden. Die Zugabe von 1,5 g Bio-Beads™ SM-2 (Bio-Rad) und die Inkubation von zwei Stunden rollend bei 4°C entzogen dem Protein das umgebende Detergenz, wodurch die Zusammenlagerung der Komponenten zu Nanodiscs realisiert werden konnte. Nach dem vollständigen Herabsinken der Bio-Beads konnte der Überstand abpipettiert und über Nacht mit zuvor in ND-Puffer äquilibrierter Ni-NTA-Matrix (IBA) inkubiert werden. Das Waschen erfolgte zunächst mit 20 Volumen Nanodiscs-Puffer, gefolgt von ebenfalls 20 Volumen Nanodiscs-Puffer mit 20 mM Imidazol. Eluiert wurde mit 1 ml Nanodisc-Puffer welcher 250 mM Imidazol enthielt. Nach der Entfernung des Imidazols durch Umpuffern (siehe Abschnitt 3.6.6), wurden mittels LMW-Marker die Proteinkonzentrationen, sowie die Konzentration der Gürtelproteine bestimmt

und in Verhältnis gesetzt (siehe Abschnitt 3.6.7). Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine Disc durch zwei MSP-Proteine stabilisiert wird. Das Verhältnis von Membranprotein und MSP kann folglich Aufschluss über das Vorhandensein von Monomeren oder Dimeren in der Nanodisc geben.

#### Nanodisc-Puffer

Tris-HCl (pH 7.5)	20 mM
NaCl	100 mM

Tab. 11: Ansätze zur Rekonstitution von PdeC<sup>wt</sup> und PdeC TM2+EAL in Nanodiscs

	Gewicht	eingesetztes Volumen	Stoffmenge in 1 µl
PdeC <sup>wt</sup> : 1	551 µg	1 ml	9,03 nmol
MSP1D1: 3	750,3 µg	366 µl	18 nmol
Lipid: 1000	6,5 mg	773 µl (in Nanodisc-Puffer)	9 µmol
PdeC TM2+EAL: 1	116 µg	1 ml	3,31 nmol
MSP1D1: 3	414,1 µg	202 µl	9,93 nmol
Lipid: 1000	2,38 mg	284 µl (in Nanodisc-Puffer)	3,31 µmol

### 3.6.12 Enzymatischer Aktivitätsnachweis von Phosphodiesterasen

Die enzymatische Aktivität von wildtypischem PdeC, proteolytischem PdeC<sup>ASS</sup>-Fragment und PdeC TM2+EAL-Konstrukt in Detergenz sowie PdeC<sup>wt</sup> und PdeC TM2+EAL in Nanodiscs, wie die lösliche EAL-Domäne in Pufferstock mit 5 % Glycerin wurde anhand von radioaktiv markiertem [ $P^{33}$ ]-c-di-GMP ermittelt. Der Versuch erfolgte mit 20 µl Ansätzen, welche 17 µl des Proteins (Endkonzentration 0,2-1 µM), 1 µl DTT (6,5 mM) oder Puffer, 1 µl MgCl<sub>2</sub> (10 mM) sowie 1 µl [ $P^{33}$ ]-c-di-GMP (16,5 nM; 3000 Ci/mmol; Hartmann Analytik) enthielten. Direkt nach Zugabe des Substrats wurden die Ansätze bei 30°C für 60-90 min inkubiert. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurden 5 µl Probe entnommen und mit 5 µl EDTA (0,5 mM) versetzt. Zur Größenkontrolle des Zerfallproduktes diente ebenfalls radioaktiv markiertes [ $P^{33}$ ]-GTP. Die Auftrennung von dem Substrat und dessen Syntheseprodukten gelang mithilfe einer Dünnschichtchromatographieplatte (Polygram CEL 300 PEI; Machery Nagel). Als Laufmittel diente gesättigtes NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 1,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> im Verhältnis 1:1,5. Im Anschluss wurden die aufgetrennten Proben mittels Phosphorimaging visualisiert.



### 3.7 Datenbanken und bioinformatische Analysen

Folgende Datenbanken dienen der Analyse von Genen und Proteinen sowie ihrer Sequenzen:

NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

EcoCyc ([www.ecocyc.org](http://www.ecocyc.org))

UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))

ExPASy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org))

PFAM ([www.pfam.xfam.org](http://www.pfam.xfam.org))

CBS prediction Server ([www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk))

Sequenzvergleiche multipler Gene wurden mithilfe der Multalin version 5.4.1 ([www.multalin.toulouse.inra.fr](http://www.multalin.toulouse.inra.fr)) realisiert (Corpet, 1988).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vergleichende Analyse der CSS-Domänen PDEs aus *E. coli* K-12

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen fünf der dreizehn c-di-GMP-spezifischen Phosphodiesterasen (PDEs) aus *E. coli* K-12. PdeB, PdeC, PdeD, PdeG und PdeN besitzen neben ihrer EAL-Domäne eine, im Periplasma lokalisierte, N-terminale Sensordomäne mit 2 hochkonservierten Cysteinen. Eines dieser Cysteine ist Teil des CSS(Cys-Ser-Ser)-Motivs, welches der CSS-Domäne ihren Namen gibt (Spurbeck *et al.*, 2012; Hengge *et al.*, 2015a). Die Fähigkeit zweier benachbarter Cysteinreste reversibel zu einer Disulfidbrücke oxidiert zu werden, könnte innerhalb der CSS-Domäne zu einer vom Redoxstatus-abhängigen Regulation der EAL-Domäne und dessen Aktivität führen. In Expressionsstudien für PdeC, PdeB, PdeD und PdeG konnte ein RpoS-abhängiges Wachstum in Flüssigkultur gezeigt werden, PdeN hingegen wurde eher in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert (Sommerfeldt *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2006). Neben diesen Daten liegen derzeit kaum weitere Erkenntnisse über diese Proteine in *E. coli* vor. Daher soll diese Arbeit, auf Basis der konservierten Struktur, eine potentielle Redoxregulation sowie den Wirkmechanismus der CSS-Phosphodiesterasen, insbesondere im Hinblick auf die Biofilmbildung aufklären.

#### 4.1.1 CSS-PDEs zeigen eine homologe Aminosäurestruktur mit 2 konservierten Cysteinen in der periplasmatischen Schleife

Zum Abbau des sekundären Botenstoffes c-di-GMP werden spezifische Phosphodiesterasen benötigt. Das Genom von *E. coli* kodiert für 13 EAL-Domänenproteine mit einem konservierten E(A/V/I)L-Motiv, welches notwendig für die Aktivität einer PDE ist. N-terminal an die EAL-Domäne geknüpft, befinden sich eine oder mehrere Sensordomänen, welche unterschiedliche Signale wahrnehmen können. Somit weisen Phosphodiesterasen oft eine multiple Domänenstruktur auf und können sowohl löslich im Cytoplasma als auch membranintegriert sein (Galperin *et al.*, 2001; Povolotsky & Hengge, 2015).

Im besonderen Fall der CSS-PDEs befindet sich die EAL-Domäne gekoppelt an eine N-terminale CSS-Domäne, die von je einem Transmembransegment flankiert wird (Abb. 1 A) (Daley *et al.*, 2005; Hengge *et al.*, 2015a). Die Domänenstruktur dieser Proteine weist eine hohe Ähnlichkeit auf, sodass auch die Anzahl der Aminosäuren und somit die Größe der Proteine aufgrund ihres nahezu identischen Aufbaus annähernd gleich ist. Daley *et al.* haben 2009 in einer umfangreichen topologischen Analyse des Proteoms der inneren Membran von *E. coli* für PdeC, PdeB und PdeN das Vorhandensein von 2

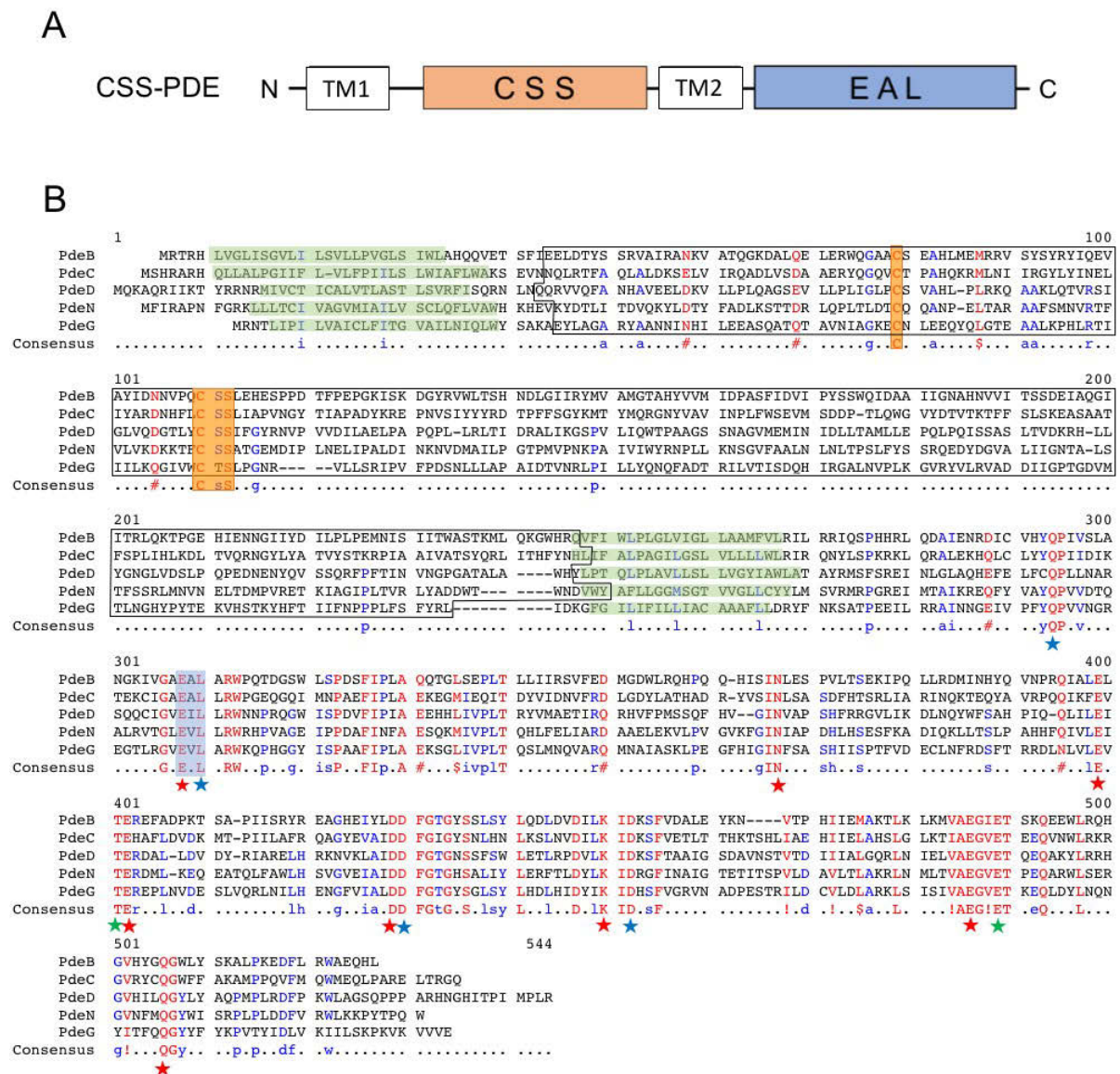
Transmembranhelices beschrieben und die Lage des C-Terminus auf das Cytoplasma festlegen können. Für PdeD und PdeG gibt es diesbezüglich keine Daten innerhalb dieser Studie (Daley *et al.*, 2005). Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zu den anderen drei CSS-PDEs sowie Hydrophobizitätsanalysen zur Vorhersage von Transmembranbereichen (TMHMM Server v. 2.0), lässt sich auch bei PdeG und PdeD eine solche Anordnung vermuten. Mit Blick auf die Domänenstruktur scheinen PdeB und PdeC identisch. Sowohl CSS- als auch EAL-Motiv der entsprechenden Domänen beider Proteine liegen hochkonserviert vor (Abb. 6).

Schaut man jedoch auf die aktuell zur Verfügung stehenden Genomsequenzen zeigt sich, neben den konservierten Motiven, eine große Variabilität in der Abfolge der Aminosäuren. Besonders die CSS-Domäne, verglichen mit der EAL-Domäne, weist neben den beiden konservierten Cysteinen praktisch keine Ähnlichkeit bei der Abfolge der Aminosäuren auf. Anders sieht es bei der Betrachtung der Länge dieser Domänen aus, die basierend auf der Pfam-Protein-Datenbank in allen 5 Proteinen rund 200 Aminosäuren beträgt (Abb. 6 B). Für PdeD, PdeG und PdeN lässt sich in mindestens einer Domäne ein Aminosäureaustausch, innerhalb der konservierten Motive, feststellen. So ist in der EAL-Domäne von PdeD das konservierte Alanin des EAL-Motivs durch ein Isoleucin, in PdeG und PdeN durch ein Valin ausgetauscht. Diese Varianten können jedoch potentiell immernoch c-di-GMP binden und umsetzen (Galperin, 2005).

Durch das Vorhandensein weiterer essentieller Aminosäuren für Bindung (Abb. 6 B blauer Stern) und Katalyse (Abb. 6 B grüner Stern) von c-di-GMP, sowie Bindung des Kofaktors  $Mg^{2+}$  (Abb. 6 B roter Stern) sind alle CSS-PDEs mit hoher Wahrscheinlichkeit enzymatisch aktiv (Spurbeck *et al.*, 2012). Für PdeN, PdeD und PdeC konnte schon ein Einfluss auf c-di-GMP-abhängige Prozesse gezeigt werden, *in vivo* Daten zur enzymatischen Aktivität liegen jedoch nur im Fall der Phosphodiesterase PdeN in *Salmonella typhimurium* vor (Huang *et al.*, 2013; Brombacher *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2013). PdeG weist als einziges CSS-Domänenprotein eine Aminosäuremutation in dem konservierten CSS-Motiv auf, bei dem das erste Serin durch ein Threonin ausgetauscht ist. Beide Aminosäuren besitzen ähnliche chemische Eigenschaften, daher ist eine Beeinträchtigung des potentiellen Redoxmechanismus eher unwahrscheinlich. Ferner stellt sich die Frage, ob und in welchem Maß die Serine des CSS-Motivs überhaupt an der Bildung der Disulfidbrücke zwischen den konservierten Cysteinen beteiligt sind.

Festzuhalten ist, dass alle fünf CSS-PDEs aus *E. coli* eine stark konservierte Domänenstruktur aus zwei Transmembranhelices, einer periplasmatischen CSS-Domäne sowie einer im Cytoplasma lokalisierten EAL-Domäne aufweisen. Die EAL-Domänen aller CSS-PDEs besitzen außerdem alle essentiellen Aminosäuren zur Ausführung der spezifischen PDE-Aktivität. Aufgrund der hochkonservierten Cysteine innerhalb der CSS-

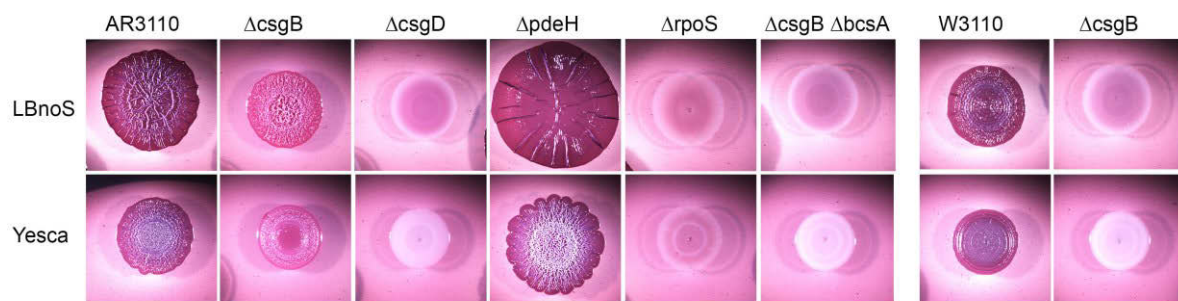
Domäne, wohingegen alle anderen Aminosäuren sehr variabel scheinen, ist eine wichtige Rolle dieser Cysteine bei der Wahrnehmung von äußeren Signalen denkbar.



**Abb. 6: Domänenstruktur und Sequenzvergleich aller CSS-Phosphodiesterasen aus *E. coli* K-12.** **A)** Alle CSS-PDEs aus *E. coli* K-12 kennzeichnet eine homologe Domänenstruktur bestehend aus einer periplasmatischen CSS-Domäne (orange), flankiert von je einem Transmembranbereich (TM) und gekoppelt an eine C-terminale EAL-Domäne (blau). **B)** Sequenzvergleich mit hierarchischer Clusterung generiert durch Multalin version 5.4.1 (Corpet, 1988). Bereiche mit hohem Konsensus (100%) sind rot dargestellt, geringerer Konsensus (60%) ist blau gekennzeichnet. Konsensussequenzen mit chemisch oder strukturell nah verwandten Aminosäuren sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: ! (Valin oder Isoleucin); \$ (Leucin oder Methionin); # (Asparagin, Glutamin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure). Grün unterlegte Bereiche zeigen prognostizierte Transmembranbereiche ermittelt mit dem TMHMM Server v. 2.0 (Daley et al., 2005). Die konservierten Cysteine in der CSS-Domäne, eines innerhalb des CSS-Motivs, sind orange unterlegt, das namensgebende EAL-Motiv der EAL-Domäne blau. Essentielle Aminosäuren für die Bindung von c-di-GMP (blau) und den Kofaktor  $Mg^{2+}$  (rot) sowie für die katalytische Aktivität der Phosphodiesterase (grün) sind mit Sternchen markiert. Die Box umschließt alle Aminosäuren, welche mit Hilfe der Pfam-Protein-Datenbank der CSS-Domäne zugeordnet werden konnten (Finn et al., 2008).

#### 4.1.2 Einfluss der CSS-PDEs auf die Morphologie einer Makrokolonie

Die Morphologie einer Makrokolonie ist komplex und abhängig vom Vorhandensein und Zusammenspiel verschiedener Matrixkomponenten wie Curli-Fasern und Cellulose (Serra et al., 2013a; Serra et al., 2013b). Wachsen Makrokolonien des Cellulose- und Curli-Fasern-produzierenden *E. coli* K-12 Derivates AR3110 abgedunkelt auf nährstoffreichen LBnoS (LB ohne Salz)-Agarplatten mit Kongorot, kommt es zur Ausbildung eines charakteristischen Phänotyps, welcher sich durch auftürmende radiale Stege eine dunkle Rotfärbung und großflächiges Wachstum auszeichnet (Serra et al., 2013a). Diese Makrokolonien bilden demnach eine komplexe 3D-Struktur aus radial emporsteigenden Stegen und kleinen Fältchen, sonst ist das Erscheinungsbild der Kolonie eher flach, räumlich weit ausgedehnt und durch die Bindung des Indikator-Farbstoffes Kongorot dunkelrot-violett. Bei der Verwendung von ebenfalls nährstoffreichem Yesca-Medium, welches Anstelle von Trypton in LB-Medium mit Casaminosäuren supplementiert wird, ist die dreidimensionale Struktur weniger stark ausgeprägt und die Kolonie klein und eher flach (Abb. 7).



**Abb. 7: Die veränderte Matrixkomposition in Makrokolonien führt zu charakteristischen Phänotypen.** Auf Kongorot-haltigen Agarplatten mit LBnoS- oder Yesca-Medium wurden je 5 µl einer Übernachtskultur von Derivaten des *E. coli* K-12 Stammes getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt inkubiert. Anhand des ausschließlich Curli-Fasern-exprimierenden Stammes W3110 (rechts) und des zusätzlich Cellulose-produzierenden Stammes AR3110 (links) wurden die phänotypischen Auswirkungen von Gendelektionen der Curli-Untereinheit CsgB, des Transkriptionsfaktors der Biofilmsynthese CsgD, der zentralen Phosphodiesterase PdeH, des Sigmafaktors der generellen Stressantwort RpoS sowie der katalytischen Untereinheit der Cellulosesynthase BcsA untersucht.

Bei den Casaminosäuren handelt es sich, wie bei Trypton, um eine Mischung aus Aminosäuren und kleinen Peptiden. Der Unterschied liegt in der vollständigen enzymatischen Hydrolyse von Casein bei den Casaminosäuren, so dass hier vorwiegend freie Aminosäuren vorliegen und weniger Oligopeptide (BD, 2006; Fraser & Powell, 1950). Die hier verwendeten Casaminosäuren haben zudem eine geringere Konzentration an Eisen und keinerlei nachweisbare Kohlenhydrate im Vergleich zu Trypton, welches im Gegensatz zu Casaminosäuren frei von NaCl ist (BD, 2006). Der Vorteil bei der phänotypischen

Analyse von Makrokolonien auf Yesca-Medium ist, dass strukturverstärkende Mutationen im Vergleich zum LBnoS-Medium im *E. coli* K-12 Stamm deutlicher in Erscheinung treten. Somit können auch geringe Veränderungen verbunden mit erhöhter Matrixproduktion sichtbar gemacht werden. Bei der Verwendung des Luria-Bertani-Mediums im Zusammenhang mit phänotypischen Makrokolonieuntersuchungen wurde auf die Zugabe von NaCl verzichtet, da geringe Osmolarität zu einer erhöhten Synthese von Curli-Fasern beiträgt (Prigent-Combaret et al., 2001).

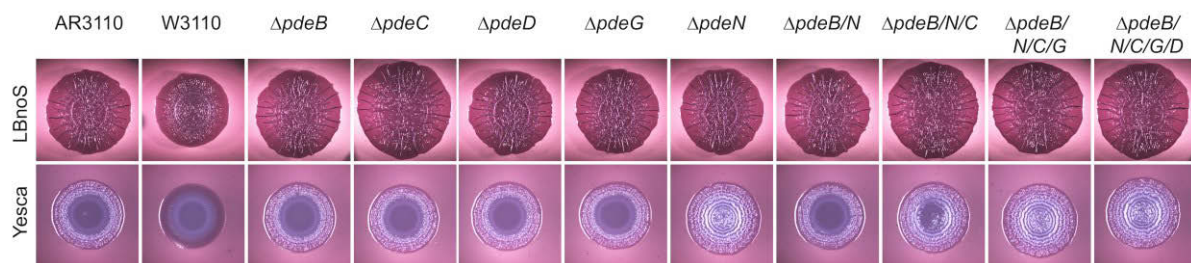
Abbildung 6 zeigt Makrokolonien des Curli- und Cellulose-produzierenden *E. coli* K-12 Stammes AR3110 (links) und des Vorläuferstammes W3110 (rechts), welcher ausschließlich Curli-Fasern synthetisiert. Gendeletionen, die zum Verlust der Expression globaler Biofilmregulatoren führen, zeigen spezifische Phänotypen, die auf ihre Rolle bei der Synthese der extrazellulären Matrixbestandteile zurückgeführt werden können (Vergleich Abb. 3 und Abb. 7). Im hierarchisch aufgebauten Netzwerk der Biofilmbildung, welches invers zur Flagellensynthese bei hohen c-di-GMP Konzentrationen aktiviert wird, befindet sich der Sigmafaktor RpoS an der Spitze (Abb. 3). Diese Position spiegelt auch die Makrokolonie eines *rpoS*-defizienten Stammes wieder, welcher nahezu komplett weiß erscheint und keinerlei Oberflächenstrukturen mehr aufweist. Ähnlich verhält es sich bei der Deletion des Gens, welches für den Transkriptionsfaktor CsgD kodiert, sowie einer  $\Delta csgB\Delta bcsA$ -Doppelmutante im AR3110-Hintergrund. Im Cellulose-negativen W3110-Hintergrund führt bereits die Deletion der Curli-Struktureinheit *csgB* zu Farb- und Strukturverlust in der Makrokolonie, während die gleiche Mutation durch das Vorhandensein von Cellulose im AR3110-Stamm noch Kongorot binden kann und eine fein gefaltete Oberfläche zeigt. Hier wird zur vollständigen Reduktion der Matrixstrukturen die zusätzliche Gendeletion der Cellulosesynthase BcsA benötigt. Werden Curli-Fasern als einzige Matrixbestandteile synthetisiert, kommt es zur Ausbildung einer ringförmigen Oberflächenstruktur der Makrokolonien, wie der W3110-Stamm zeigt.

In dem *rpoS*-defizienten Stamm können weder Curli-Fasern noch Cellulose hergestellt werden, trotzdem erscheint die flache Kolonie noch leicht bräunlich. Besonders gut ist dies auf dem Yesca-Medium zu beobachten, da hier die Gendeletion des Masterregulators CsgD zu komplett weißen Kolonien führt. Diese Färbung könnte auf eine weitere Matrixkomponente hindeuten, die unabhängig von RpoS exprimiert wird, beispielsweise das Exopolysaccharid PGA. Bei der Betrachtung der Cellulose- und Curli-negativen Kolonien fällt außerdem auf, dass auf LBnoS-Medium eine geringe Rosafärbung zurückbleibt, die auf Yesca-Medium nicht zu sehen ist. Dies könnte der Hinweis auf eine CsgD-unabhängige Aktivierung von Curli oder Cellulose sein, die jedoch auf Yesca-Medium nicht zum Tragen kommt (Da Re and Ghigo, 2006).



Wird durch die Deletion von *pdeH* ein künstlich hoher zellulärer Spiegel an c-di-GMP generiert, resultiert dies in einer sehr flachen, räumlich weit ausgedehnten Makrokolonie, die nur noch wenige aber dafür sehr hohe radiale Stege aufweist (Sarenko *et al.*, 2017). Durch die verstärkte Produktion von Matrixsubstanzen scheint die Kolonie eine erhöhte Steifigkeit zu erlangen, die eher hinderlich für das Entstehen kleiner Fältchen ist, aber große radiale Stege stabilisiert. Ausführliche und weitreichende Studien zur Regulation und zum Einfluss der Cellulosebiosynthese auf die Makrokoloniestruktur von *E. coli* K-12 wurden bereits publiziert (Serra *et al.*, 2013a; Serra *et al.*, 2013b; Serra & Hengge, 2014).

Schaut man sich im Vergleich die Einfach- und Mehrfachdeletionen der Gene an, welche für die CSS-Domänen-Phosphodiesterasen kodieren, fallen keine solchen drastischen Veränderungen im Cellulose-positiven AR3110-Hintergrund auf (Abb. 8). Dennoch zeigen insbesondere auf Yesca-Medium gewachsene Kolonien differenzierte Phänotypen. So ist die Bildung kleiner Fältchen und einer inneren Ringstruktur bei der Deletion einzelner und multipler CSS-PDEs zunehmend stärker ausgeprägt und scheint sogar additiv zu sein. Diese additive Wirkung der Mehrfach-Knockouts ist sowohl auf Yesca- als auch auf LBnoS-Medium sichtbar und zeigt sich ab der Deletion von 3 CSS-PDEs ( $\Delta pdeB\Delta pdeN\Delta pdeC$ ).



**Abb. 8: CSS-PDEs führen zu keinen signifikanten Veränderungen der Makrokoloniestruktur.** Auf Kongorot-haltigen Agarplatten mit LBnoS- oder Yesca-Medium wurden je 5  $\mu$ l einer Übernachtskultur von Derivaten des *E. coli* K-12 Stammes getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt inkubiert. Untersucht wurde der Cellulose- und Curli-Fasern-produzierende Stamm AR3110 sowie Einzel- und Mehrfachdeletionen der fünf CSS-Phosphodiesterasen aus *E. coli* K-12. Der Cellulose-negative Stamm W3110 diente als Referenz.

Einzelmutanten weisen hingegen einen wildtypartigen Koloniephänotypen auf. Gering verstärkte Strukturierungen am Rand der Kolonien lassen jedoch auf einen gewissen Einfluss der CSS-PDEs auf die Morphologie und somit Matrixsynthese schließen. Die Deletion von  $\Delta pdeN$  bildet hiervon eine Ausnahme, im Gegensatz zu den anderen Mutationen kommt es hier zu einer verstärkten Strukturierung mit vielen kleinen sich auftürmenden Fältchen im Zentrum der Makrokolonie. Diese Veränderung kann jedoch nur auf Yesca-Medium beobachtet werden, auf LBnoS sind Wildtyp-Kolonie und *pdeN*-Mutante nahezu identisch. Andersherum verhält es sich bei  $\Delta pdeC$ . Auf LBnoS-Medium gewachsene

Kolonien, denen das *pdeC* Gen fehlt, sind etwas größer und flacher als der Wildtyp. Auf Yesca-Platten ist unter gleichen Bedingungen kein Unterschied feststellbar.

Deletionen von EAL-Domänenproteinen, wie beispielsweise PdeH, sind potentiell in der Lage, eine Veränderung der Makrokoloniestruktur durch erhöhte c-di-GMP-Spiegel hervorzurufen. Natürlich spielen dabei diverse Faktoren wie die Expression, posttranslationale Modifikationen, Proteolyse und Aktivitätszustand, d.h. generelle Funktion und Regulation der spezifischen Phosphodiesterasen, eine maßgebliche Rolle. Daher soll diese Arbeit zur Aufklärung der Bedingungen beitragen, unter denen diese Art der Phosphodiesterasen aktiv ist und zur Modulierung c-di-GMP-abhängiger Prozesse beitragen kann.

## 4.2 Untersuchung des funktionellen Mechanismus von CSS-PDEs am Beispiel von PdeC

PdeC als eine der fünf CSS-PDEs diente in dieser Arbeit als Modell zur Untersuchung dieser neuen Art von EAL-Domänenproteinen. Insbesondere die molekulare Funktion der konservierten periplasmatischen Cysteine und deren Auswirkung auf die Aktivität der EAL-Domäne soll anhand von PdeC geklärt werden. Unter Verwendung der BLAST-Funktion von Altschul et al. und einem anschließenden multiplen Sequenzalignment konnte gezeigt werden, dass PdeC vor allem in der Familie der *Enterobacteriaceae* weit verbreitet ist (Corpet, 1988; Altschul et al., 1997).

Im Folgenden wurden 5 Gattungen der zu den Gammaproteobakterien gehörenden Bakterienklasse herangezogen und deren PdeC-Homologe anhand aktueller Genomsequenzen verglichen (Abb. 9). Es stellte sich heraus, dass *Shigella flexneri* und *Escherichia coli* ein bis auf 3 Aminosäuren (Abb. 9, grün unterlegt) identisches PdeC-Homolog besitzen. Beide Spezies sind nah verwandt, frühe phänotypische und molekulare Studien ordneten *Shigella* sogar den *E. coli* Spezies zu. Aktuell wird eher die Zusammenlegung der zwei Genera *Escherichia* und *Shigella* in eine Gattung postuliert, jedoch nicht die Aufnahme der *Shigella* in die *E. coli* Spezies (G. Zuo et al., 2013). Aufgrund dieses sehr nahen Verwandtschaftsverhältnisses ist es nicht verwunderlich, dass beide Proteine eine fast identische Aminosäuresequenz aufweisen. Das in *Klebsiella pneumoniae* befindliche Homolog zeigte hingegen eine 20 Aminosäuren-umfassende Deletion direkt am Anfang des Proteins und damit die größte Abwandlung von der Kernsequenz unter den hier verglichenen Spezies. Gemeinhin zeigen alle PdeC-Homologe große konservierte Bereiche mit hohem Konsensus (Abb. 9, rot) und nur sehr wenige Abweichungen in der Aminosäuresequenz. Besonders die EAL-Domäne ist nahezu komplett konserviert und weist alle wichtigen Aminosäuren auf, welche notwendig für die Bindung von c-di-GMP sowie die



katalytische Aktivität sind (siehe vgl. Abb. 6). Demnach können die PdeC-Homologe aller hier gezeigten Gammaproteobakterien potentiell c-di-GMP binden und degradieren. Für die Modellorganismen *Salmonella enterica* und *Klebsiella pneumoniae* wurde bereits ein Zusammenhang von PdeC mit c-di-GMP-abhängigen Prozessen experimentell nachgewiesen (Simm *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2013).

Verglichen mit der EAL-Domäne zeigt die CSS-Domäne stärkere Variabilität bezüglich der Aminosäuresequenz, aber auch hier sind große Bereiche konserviert. Wichtig ist zudem, dass besonders die 2 konservierten Cysteine an Position 75 und 106 (in *K. pneumoniae* 55 und 86) zu finden sind. Auf das im CSS-Motiv lokalisierte Cystein 106 folgen zwei ebenfalls konservierte Serine, von denen jedoch das zweite an Position 108 (in *K. pneumoniae* 88) in den Spezies *S. enterica*, *K. pneumoniae* und *Enterobacter spp.* zu einem Threonin ausgetauscht wurde (Abb. 9 orange unterlegt). Beide Aminosäuren besitzen jedoch gleiche chemische Eigenschaften und unterscheiden sich lediglich durch eine zusätzliche Methylgruppe. *E. coli* und *S. flexneri* weisen 3 weitere Cysteine im cytoplasmatischen Teil des Proteins auf, die 3 anderen hier untersuchten Spezies besitzen zudem ein zusätzliches 4. Cystein in der 2. annotierten Transmembrandomäne des PdeC-Homologs (siehe vgl. Abb. 6 und Abb. 9).

Die hier verglichenen PdeC-Homologe aus der Gruppe der *Enterobacteriaceae*, kennzeichnet eine hohe Homologie, besonders im Hinblick auf die EAL-Domäne und die konservierten Cysteine in der periplasmatischen Domäne. Die EAL-Domänen der hier untersuchten Homologe besitzen alle zur c-di-GMP-Bindung und -Hydrolyse wichtigen Aminosäuren. Daher sind diese Proteine vermutlich aktive PDEs in denen 2 periplasmatische Cysteine potentiell wichtige Funktionen für die Signalintegration übernehmen könnten. Denn diese Cysteine sind nicht nur in *E. coli* unter allen CSS-PDEs konserviert, sondern ebenso innerhalb mehrerer Spezies (siehe vgl. Abb. 6 B und Abb. 9).



#### 4.2.1 Einfluss plasmidkodierter PdeC-Derivate auf die Makrokoloniemorphologie

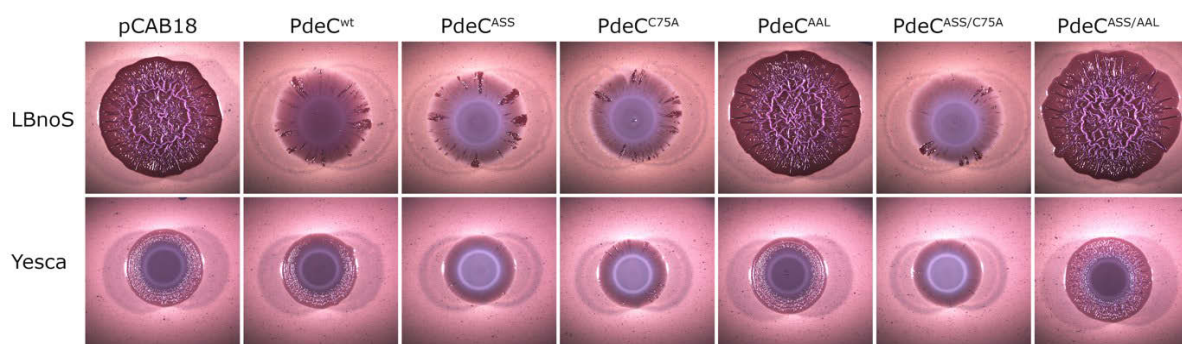
PdeC als eine der 5 CSS-PDEs in *E. coli* stellt eine voraussichtlich aktive PDE dar, dessen konservierte redox-sensitive Cysteine in der N-terminalen Sensordomäne, potentiell die Aktivität der C-terminal gelagerten EAL-Domäne kontrollieren können. Durch die räumliche Nähe beider Cysteine zueinander kann es, unter oxidierenden Bedingungen, zur Bildung einer Disulfidbrücke (DSB) kommen. Andererseits können die Thiolgruppen der Cysteine unter eher reduzierenden Bedingungen auch frei vorliegen. Je nachdem, in welchem Redoxzustand die Cysteine sich befinden, kann es zu Strukturveränderungen des Proteins kommen und die Aktivität der gekoppelten EAL-Domäne beeinflusst werden.

Zur Untersuchung der Aktivitätskontrolle wurde der ORF von *pdeC* auf den Niedrigkopien-Vektor pCAB18 kloniert. pCAB18 besitzt einen IPTG-induzierbaren *tac*-Promotor ( $p_{tac}$ ), der jedoch auch ohne Induktion eine geringe Expression nachfolgender Gene erlaubt (Barembuch and Hengge, 2007). Somit kann pCAB18 zur moderaten Expression, aber auch zur Überexpression von PdeC, unter Zuhilfenahme des Induktors genutzt werden. Neben dem wildtypischen Leserahmen von *pdeC* wurden noch 5 weitere *pdeC*-Varianten auf den pCAB18-Vektor kloniert und befinden sich demnach unter Kontrolle des *tac*-Promotors. Diese kodieren PdeC-Derivate, in denen eines oder beide der konservierten Cysteine durch Alanine ausgetauscht wurden (PdeC<sup>ASS</sup>, PdeC<sup>C75A</sup> und PdeC<sup>ASS/C75A</sup>) sowie Mutanten, bei denen das funktionelle EAL-Motiv durch ein AAL-Motiv ersetzt wurde (PdeC<sup>AAL</sup>), was zum Verlust der PDE-Aktivität führt (Lindenberg et al., 2013). Die AAL-Mutation wurde zudem mit einer ASS-Variante kombiniert (PdeC<sup>ASS/AAL</sup>) um ein enzymatisch inaktives, DSB-defizientes PdeC-Konstrukt zu erhalten.

Die generierten Plasmide wurden zur phänotypischen Analyse in den Curli- und Cellulose-positiven *E. coli* K-12 Stamm AR3110 transformiert. Auf LBnoS-wachsende Makrokolonien, die das PdeC<sup>wt</sup>-Plasmid trugen und somit wildtypisches PdeC in geringem Maße überexprimierten, zeigten eine deutlich reduzierte Oberflächenstruktur (Abb. 10). In PdeC-Varianten, denen eines oder beide der konservierten Cysteine fehlten, verstärkte sich dieser Effekt, sichtbar durch eine heller erscheinende Kolonie als Konsequenz geringerer Kongorot-Bindung. Auf Yesca-Platten wurde kein Unterschied zwischen PdeC<sup>wt</sup>-exprimierenden und Leerplasmid-tragenden Kolonien sichtbar. Hier zeigten beide Makrokolonien peripher kleine Fältchen und Aufwölbungen. Deutlich sichtbar war hier der verstärkt reduzierende Effekt der Cystein-Mutation. Während PdeC<sup>wt</sup> auf Yesca-Medium am Rand noch oberflächliche Strukturierung zeigte, fehlte diese ganz und gar in den Varianten PdeC<sup>ASS</sup>, PdeC<sup>C75A</sup> und PdeC<sup>ASS/C75A</sup>. Diese Effekte könnten auf eine erhöhte enzymatische

Aktivität der EAL-Domäne dieser PdeC-Varianten zurückgeführt werden, die verringerte c-di-GMP Konzentration und somit geringe oder keine Matrixproduktion zur Folge hätte. Bestätigt wurde diese Vermutung anhand der PdeC-Derivate, bei denen die katalytische Aktivität durch eine AAL-Mutation eliminiert war. Die Varianten PdeC<sup>AAL</sup> und PdeC<sup>ASS/AAL</sup> sind von der Kolonie mit dem Leerplasmid nicht differenzierbar und bilden eine komplexe 3-dimensionale Struktur aus.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die konservierten Cysteine der CSS-Domäne die PDE-Aktivität von PdeC beeinflussen. Können C75 und C106 durch die Mutation eines oder beider Cysteine keine Disulfidbrücke mehr bilden, scheint sich dies aktivierend auf die EAL-Domäne auszuwirken. Unter reduzierenden Bedingungen könnte also eine erhöhte enzymatische Aktivität von PdeC erwartet werden.



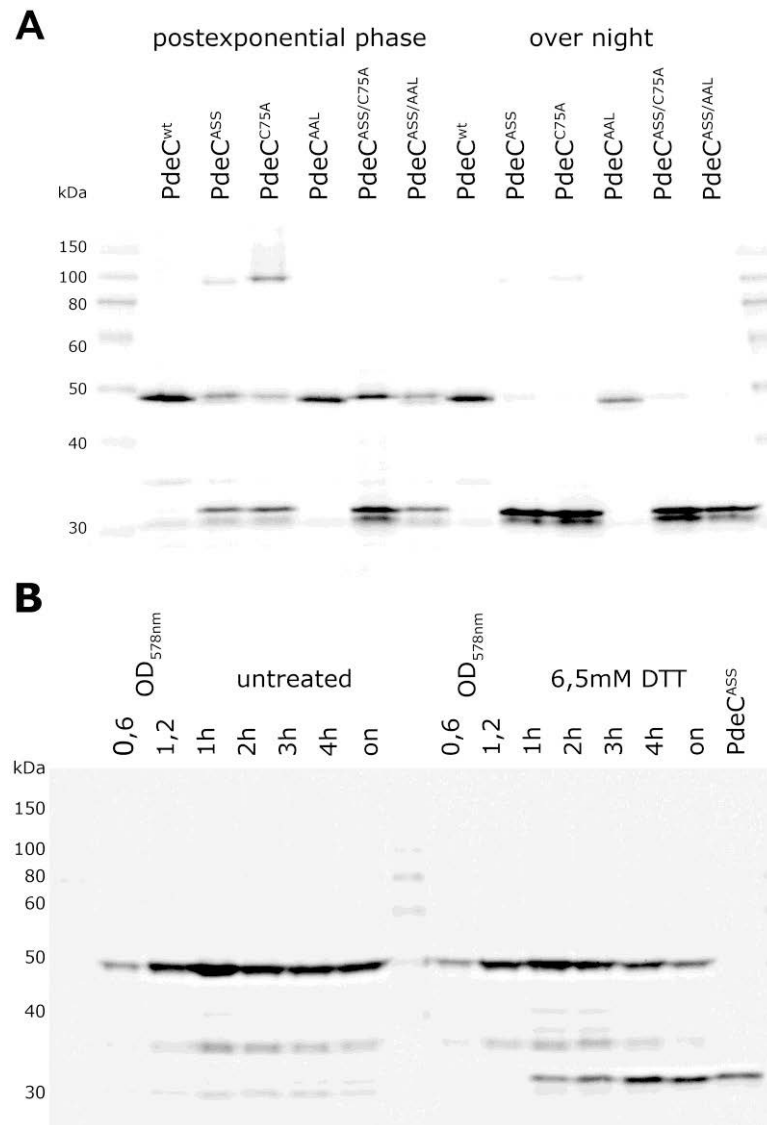
**Abb. 10: Plasmid-kodierte PdeC-Derivate verändern die Matrixsynthese einer *E. coli* K-12 Makrokolonie.** Auf Kongorot- und Ampicillin-haltigen Agarplatten mit LBnoS- oder Yesca-Medium wurden je 5 µl einer Übernachtskultur des *E. coli* K-12 Stammes getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt inkubiert. Untersucht wurde der Cellulose- und Curli-Fasern-produzierende Stamm AR3110, welcher die verschiedenen auf pCAB18 befindlichen PdeC-Derivate exprimierte: PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF), PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation), PdeC<sup>C75A</sup> (*pdeC* ORF mit C75A Mutation), PdeC<sup>AAL</sup> (*pdeC* ORF mit E303A Mutation) sowie Kombination aus C106A und C75A (PdeC<sup>ASS/C75A</sup>) und C106A und E303A (PdeC<sup>ASS/AAL</sup>).

#### 4.2.2 Prozessierung als Antwort auf einen veränderten Redoxstatus der konservierten Cysteine

Die Thiolgruppen von Cysteinen liegen unter reduzierenden Bedingungen frei vor, sind die Bedingungen hingegen eher oxidierend, kann eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen ausgebildet werden. Diese kovalente Verbindung zweier Schwefel-Atome ist sehr stabil und elementar für die Stabilität der Tertiärstruktur von Proteinen. So können innerhalb eines Proteins oder zwischen Proteinen Verknüpfungen entstehen, was in jedem Fall zu einer strukturellen Änderung führt und Einfluss auf die Aktivität der Proteine haben kann (Berkmen, 2012).

Die Makrokolonien in Abb. 10 haben gezeigt, dass die konservierten Cysteine C75 und C106 den reduzierenden Effekt auf die Matrixsynthese von PdeC noch verstärken und somit potentiell einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der EAL-Domäne ausüben. Um die Expression der PdeC-Derivate auf dem pCAB18-Plasmid zu überprüfen und Änderungen zwischen diesen ausmachen zu können, wurden Immunoblots genutzt. Zur Detektion wurde zusätzlich ein C-terminaler 6fach Histidin-*Tag* an jedes PdeC-Derivat fusioniert. Die Durchführung des Immunoblots erfolgte unter nichtreduzierenden Bedingungen, um mögliche Änderungen des Laufverhaltens durch einen veränderten Redoxstatus zu detektieren. Denn je nachdem ob eine intra- oder sogar intermolekulare Disulfidbrücke ausgebildet wird, können sich beschriebene Größe und/oder Faltung des Proteins verändern, was zu einer veränderten Migration durch die Gelmatrix führt. Am Beispiel von Lysozym, konnte die womöglich kompaktere Struktur des Proteins durch die Disulfidbrücke, bereits mit einem schnelleren Laufverhalten im SDS-Gel in Verbindung gebracht werden (Pitt-Rivers and Impiombato, 1968).

Bei der Analyse des Laufverhaltens der C-terminal getaggten PdeC-Derivate stellte sich ein interessantes Muster heraus (Abb. 11 A). Die Proteingröße von PdeC beträgt nach *Ecocyc.org* etwa 60,8 kDa, das PdeC<sup>wt</sup>-exprimierende Plasmid zeigte jedoch eine Bande bei ungefähr 50 kDa. Neben der Ungenauigkeit des Markers, welcher vorwiegend lösliche Proteine enthält, ist das schnellere Laufverhalten im SDS-Gel für Membranproteine nicht ungewöhnlich und steht im Zusammenhang mit einer veränderten Bindung an das Detergenz SDS (Rath et al., 2009).



**Abb. 11: Die Abwesenheit der Disulfidbrücke innerhalb der CSS-Domäne führt zur Prozessierung von PdeC.** Immunoblot zur Detektion von 6fach-Histidin-getaggten PdeC-Derivaten auf pCAB18, exprimiert im *E. coli* Stamm W3110 bei 28°C in LB-Medium mit Ampicillin. Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 30 µg Gesamtprotein aus **A**) der postexponentiellen Wachstumsphase und über Nacht gewachsenen Zellen (over night) von den PdeC-Derivaten: PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF), PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation), PdeC<sup>C75A</sup> (*pdeC* ORF mit C75A Mutation), PdeC<sup>AAL</sup> (*pdeC* ORF mit E303A Mutation), Kombination aus C106A und C75A (PdeC<sup>ASS/C75A</sup>) und C106A und E303A (PdeC<sup>ASS/AAL</sup>), sowie aus **B**) PdeC<sup>wt</sup> exprimierenden Zellen, die bei OD<sub>578</sub> = 1,2 mit dem Reduktionsmittel DTT (6,5 mM) behandelt wurden bzw. unbehandelt blieben. Proben wurden nach 1h, 2h, 3h, 4h und über Nacht genommen. Das PdeC<sup>ASS</sup>-Plasmid diente zur Größenkontrolle des durch Reduktionsstress entstandenen Abbaufragmentes.

Erstaunlicher hingegen war das Bandenmuster, welches durch den Verlust eines oder beider konservierter Cysteine erzeugt wurde. Befanden sich die Zellen in der postexponentiellen Wachstumsphase, trat in den Derivaten PdeC<sup>ASS</sup>, PdeC<sup>C75A</sup>, PdeC<sup>ASS/C75A</sup> sowie PdeC<sup>ASS/AAL</sup> neben der wildtypischen Proteinbande, noch eine weitere Bande bei etwas über 30 kDa auf. Während in dieser Wachstumsphase das PdeC-Wildtypfragment noch sehr prominent war, konnte über Nacht in der stationären Wachstumsphase nahezu

nichts mehr davon detektiert werden. In der Stationärphase kommt der  $\sigma^{70}$ -getriebene *tac*-Promotor von pCAB18 nicht mehr zum Tragen, d.h. es findet keine Expression von PdeC mehr statt und das Wildtypfragment schien demnach fast vollkommen in dem kleineren Fragment aufzugehen, dessen Signal sich deutlich verstärkte.

Eine weitere Bande konnte in den periplasmatischen Einzel-Cystein-Varianten PdeC<sup>ASS</sup>, PdeC<sup>C75A</sup> und PdeC<sup>ASS/AAL</sup> beobachtet werden und lag bei ungefähr 100 kDa. Diese Bande war in der Cystein-freien Variante (PdeC<sup>ASS/C75A</sup>) nicht zu finden und deutet folglich auf eine Dimerisierung, also die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen zwei PdeC-Molekülen, durch das verbleibende Cystein hin. Auch das Dimer wurde über Nacht zusammen mit dem wildtypischen PdeC-Fragment in das kleinere Fragment umgewandelt. Die katalytisch inaktive PdeC<sup>AAL</sup>-Variante zeigte ausschließlich die PdeC-Wildtypbande bei ca. 50 kDa.

Um zu testen, ob der Auslöser für das Erscheinen des kleineren Fragments tatsächlich der veränderte Redoxstatus von PdeC war, wurden die Zellen mit stark reduzierenden Bedingungen konfrontiert. Dazu wurden Kulturen bis zu einer optischen Dichte von 1,2 herangezogen und mit 6,5 mM DTT behandelt. DTT (Dithiothreitol) löst aktiv Disulfidbrücken auf und führt damit zur Reduktion des Proteins. In Abb. 11 B ist deutlich zu sehen, dass es nach der Behandlung mit DTT ebenso zu einer Akkumulierung eines kleinen Fragments kommt, während die Menge des PdeC-Wildtyp-Fragments fortlaufend abnimmt.

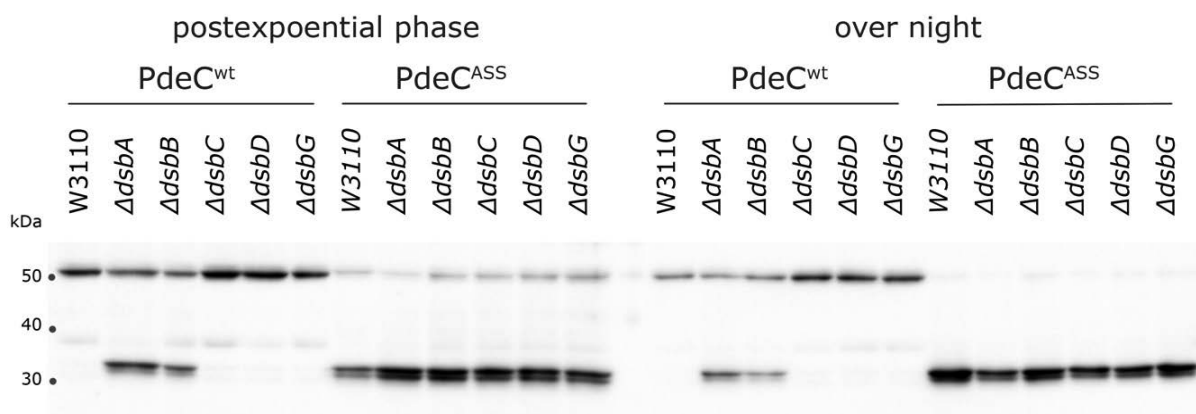
Aufgrund dieser Daten lässt sich zusammenfassen, dass die konservierten Cysteine C75 und C106 (CSS) in PdeC<sup>wt</sup> bei den hier untersuchten Bedingungen vornehmlich im oxidierten Zustand vorliegen und somit eine Disulfidbrücke ausgebildet wird. Befinden sich diese Cysteine im reduzierten Zustand, sei es dauerhaft durch den Austausch eines der Cysteine oder reversibel durch stark reduzierende Bedingungen, kommt es zum Abbau des Wildtyp-Proteins und der Akkumulation eines Degradationsproduktes.

#### 4.2.3 Oxidation durch das DsbA/DsbB-System schützt PdeC vor Proteolyse

In den vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die konservierten, periplasmatisch lokalisierten Cysteine von PdeC unter wildtypischen Bedingungen eher oxidiert, also in einer DSB vorliegen. In Abwesenheit der DSB kommt es zur proteolytischen Spaltung des Wildtypproteins und zu einer verstärkten enzymatischen Aktivität der cytoplasmatisch lokalisierten EAL-Domäne. Das folgende Experiment diene daher der Klärung einer potentiellen Einflussnahme des DSB-Systems auf den Redoxzustand der konservierten Cysteine in der CSS-Domäne von PdeC.

Dazu wurde im Immunoblot das wildtypische PdeC<sup>wt</sup>-Plasmid sowie das PdeC<sup>ASS</sup>-Plasmid, welches die C106A Mutation trägt, mittels C-terminal gekoppeltem 6fach Histidin-Tag in

Stämmen untersucht, die Mutationen im DSB-System aufwiesen. Die PdeC<sup>ASS</sup>-Variante steht auch in den folgenden Experimenten repräsentativ für alle PdeC-Derivate, welche nicht mehr zur Bildung einer Disulfidbrücke innerhalb der CSS-Domäne befähigt sind. In Abbildung 11 ist deutlich ersichtlich, dass die Deletion von  $\Delta dsbB$  und  $\Delta dsbA$  im W3110-Hintergrund in wachsenden (Abb. 12, links) wie in stationären Zellen (Abb. 12, rechts) zum Abbau von PdeC<sup>wt</sup> führte. Das reduzierende System DsbC/DsbD/DsbG hatte in wachsenden Zellen keinen Einfluss auf die hier untersuchten PdeC-Varianten. In Zellen, welche sich durch Wachstum über Nacht in der Stationärphase befanden, waren die Proteinmengen von PdeC<sup>wt</sup> im W3110-Wildtyp-Hintergrund hingegen reproduzierbar geringer als in den  $\Delta dsbD$ -,  $\Delta dsbC$ - und  $\Delta dsbG$ -Mutanten. Für die DSB-defiziente Variante PdeC<sup>ASS</sup> konnte dies nicht beobachtet werden (Abb. 12, rechts).



**Abb. 12: Das DsbA/DsbB-System schützt PdeC durch Oxidation der CSS-Domäne vor Proteolyse.** Immunoblot zur Detektion der 6fach-Histidin-getaggten pCAB18 Derivate PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF) und PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation) im *E. coli* Stamm W3110 sowie in Deletionsmutanten der für das DSB-System exprimierenden Gene des oxidierenden Signalwegs *dsbA* und *dsbB* und des reduzierenden Signalwegs *dsbC*, *dsbD* und *dsbG*. Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 30 µg Gesamtprotein von bei 28°C in LB-Medium mit Ampicillin gewachsenen Zellen der postexponentiellen (postexponential phase) und der stationären (over night) Wachstumsphase.

Das DSB-System trägt folglich entscheidend zum Redoxstatus der CSS-Domäne von PdeC bei. Die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den konservierten Cysteinen C75 und C106 wird durch das oxidierende DsbA/DsbB-System katalysiert und verhindert damit den Abbau von PdeC. Dabei bewirkt der reduzierende Teil des DSB-Systems, durch gelegentliche Angriffe auf die Disulfidbrücke der CSS-Domäne, wahrscheinlich eine gewisse Destabilisierung von PdeC<sup>wt</sup>.

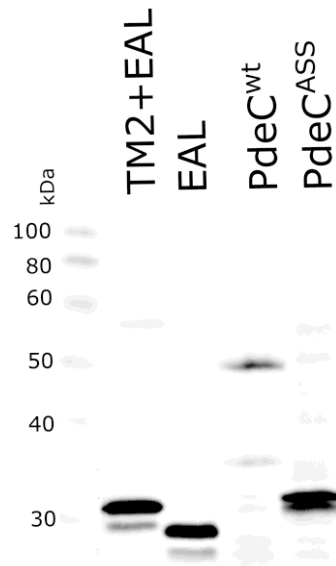
Trägt man diese Daten bezüglich Funktion und Proteolyse von PdeC zusammen zeigt sich, dass PdeC in der reduzierten Form proteolytisch prozessiert wird und verstärkte PDE-



Aktivität besitzt, wobei die wohlmöglich verringerten c-di-GMP-Spiegel die Produktion von Matrixkomponenten negativ beeinflussen. In den folgenden Abschnitten soll geklärt werden, welche Protease(n) in diesen Prozess involviert sind und ob der Abbau oder die Reduktion ausschlaggebend für die erhöhte enzymatische Aktivität von PdeC ist.

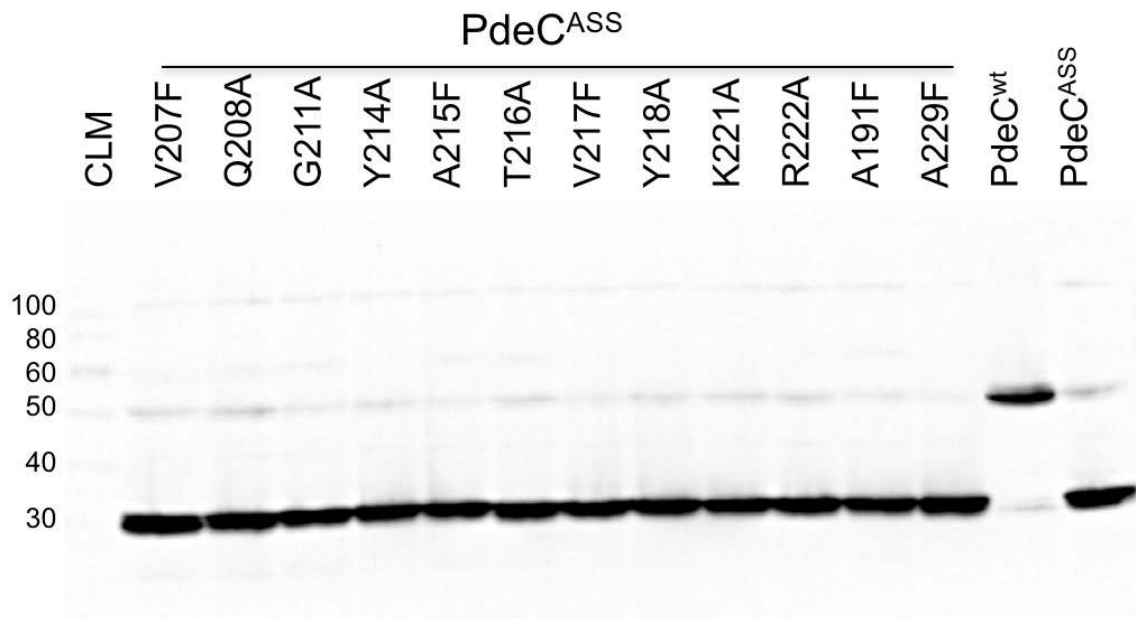
#### 4.2.4 DegP und DegQ sind für die Proteolyse von reduziertem PdeC verantwortlich

Zur Klärung der Frage, ob die Prozessierung notwendig für die Stimulation der PDE-Aktivität von PdeC ist oder die Reduktion der Disulfidbrücke zwischen C75 und C106 ausreicht, bedurfte es der Identifikation der in diesen Prozess involvierten Proteasen. Alternativ könnte dieser Aspekt durch eine reduzierte PdeC-Variante, welche nicht abgebaut werden kann, geklärt werden. Dafür sollte zunächst die Größe und damit Zusammensetzung des Abbaufragments genauer bestimmt werden. Durch die Klonierung der EAL-Domäne von PdeC allein (PdeC EAL), sowie der EAL-Domäne zusammen mit der 2. Transmembrandomäne (PdeC TM2+EAL) im Rahmen der Masterarbeit von Tina Jaenicke zeigte sich, dass das entstandene Abbaufragment aus EAL- und 2. Transmembrandomäne bestehen musste (Abb. 13). Denn die Laufhöhe des PdeC TM2+EAL Konstruktes, welches durch den *Protein Molecular Weight Calculator* (science gateway) auf eine Größe von 35,44 kDa festgelegt werden kann, befand sich im SDS-Gel ca. 2 kDa unter dem durch Proteolyse entstandenen Fragment, welches folglich ca. 37 kDa groß ist. Demnach müsste(n) die dafür zuständige(n) Protease(n) im Periplasma zu finden sein. Der N-terminus des prozessierten Fragmentes sollte sich, schaut man 2 kDa (entspricht ca. 18aa) upstream der klonierten TM2+EAL Variante in der Aminosäuresequenz von PdeC, im Bereich der Aminosäuren 210 - 220 befinden.



**Abb. 13: Das prozessierte PdeC<sup>ASS</sup> Fragment besteht aus EAL- und 2. Transmembrandomäne.** Immunoblot zur Detektion der 6fach-Histidin-getaggten pCAB18-Derivate PdeC TM2+EAL (2. Transmembrandomäne + EAL-Domäne), PdeC EAL (nur cytoplasmatische EAL-Domäne) PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF) und PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation) im *E. coli* Stamm W3110. Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 30 µg Gesamtprotein von bei 28°C in LB-Medium mit Ampicillin gewachsenen Zellen.

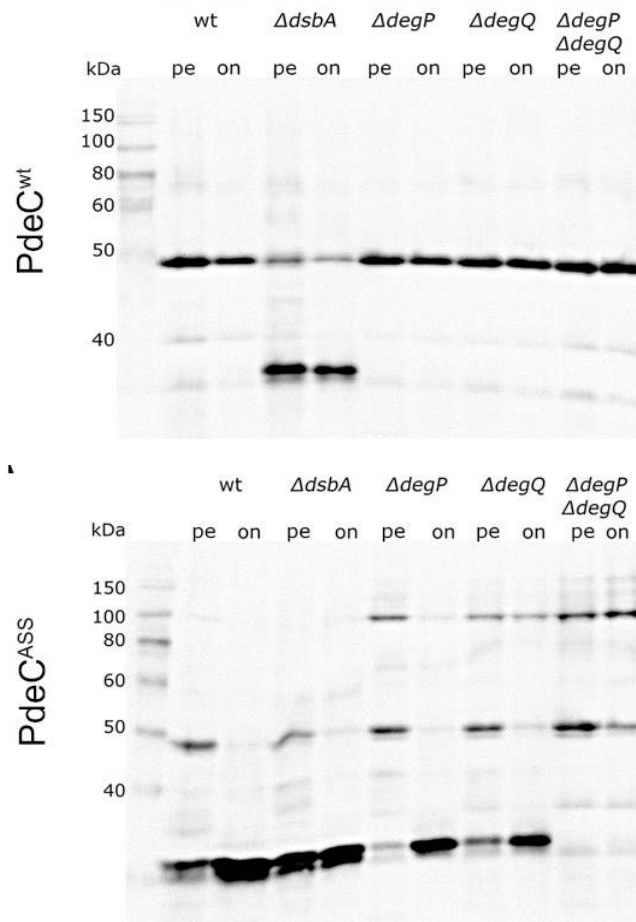
Eine Serie von einzelnen Aminosäureaustauschen innerhalb der PdeC<sup>ASS</sup>-Variante in diesem Bereich führte jedoch nicht zu geringerem oder gar verhindertem Abbau (Abb. 13). Dieses Resultat deutete auf die Mitwirkung einer oder mehrerer Proteasen, welche kein spezielles Aminosäuremotiv zur Erkennung benötigen, sondern eher unspezifisch größere ungefaltete Bereiche in Proteinen erkennen. Solche ungefalteten Bereiche können durch die Abwesenheit der Disulfidbrücke in reduziertem PdeC entstehen und den Proteasen somit einen Angriffspunkt bieten. Im Periplasma befindliche und mit dieser Art von generellem Wirkmechanismus ausgestattete Proteasen sind DegP und DegQ. Beide gehören zu der HtrA-Proteinfamilie und üben ATP-unabhängig sowohl Protease- als auch Chaperon-Aktivität aus (Hansen and Hilgenfeld, 2013). DegP und DegQ bilden komplexe Oligomere aus bis zu 24 Proteineinheiten und zeigen eine hohe Sequenzhomologie. DegP ist essentiell für das Überleben bei hohen Temperaturen. Interessanterweise kann die damit verbundene Temperatursensitivität *degP*-defizienter Stämme teilweise durch die Überproduktion von DegQ überwunden werden. Eine ähnliche bzw. überlappende Substratspezifität beider Proteasen ist daher durchaus vorstellbar (Kolmar et al., 1996).



**Abb. 14: Austausch einzelner Aminosäuren N-terminal von der TM2 in PdeC<sup>ASS</sup>.** Immunoblot zur Detektion der 6fach-Histidin-getaggtten pCAB18-Derivate PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF) und PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation) im *E. coli* Stamm W3110. Zusätzlich wurde in den PdeC<sup>ASS</sup>-Hintergrund noch je eine weitere Aminosäuremutation in dem Bereich zwischen AS 191 und AS 222 eingefügt. Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 30 µg Gesamtprotein von über Nacht bei 28°C in LB-Medium mit Ampicillin gewachsenen Zellen.

Auf Basis dieser Aspekte wurden zunächst Einzelmутanten von  $\Delta degP$  und  $\Delta degQ$  mit Hinblick auf eine Veränderung des Abbaus der PdeC<sup>ASS</sup>-Variante in Immunoblots untersucht (Abb. 15, unten). Es zeigte sich, dass es in beiden Deletionsmutanten weiterhin zum Abbau von konstant reduziertem PdeC kommt. Bei genauerer Betrachtung fiel allerdings ein etwas verändertes Bandenmuster auf. Verglichen mit dem Wildtyp-Hintergrund bzw. der  $\Delta dsbA$ -Mutante (hier als Kontrolle mitgeführt), entstand besonders in der postexponentiellen Wachstumsphase weniger prozessiertes Fragment bei vermehrter Bildung intermolekularer Dimere. Dieser Effekt konnte in der PdeC<sup>ASS</sup>-Variante sowohl in dem  $\Delta degP$ - als auch dem  $\Delta degQ$ -Deletionsstamm beobachtet werden.

Wurde im *E. coli* K-12 W3110 Stamm die Expression beider Proteasen durch Ein-Schritt-Inaktivierung verhindert, konnte tatsächlich keine Proteolyse des PdeC<sup>ASS</sup>-Konstrukts mehr nachgewiesen werden. Die Unterbindung des Abbaus der Einzel-Cystein-Variante von PdeC resultierte, besonders in der stationären Wachstumsphase bei über Nacht (on) gewachsenen Zellen, in der verstärkten Akkumulierung von PdeC-Homodimeren. Ein Einfluss auf das PdeC<sup>wt</sup>-Konstrukt konnte in keiner der Protease-Mutanten beobachtet werden (Abb. 15, oben).



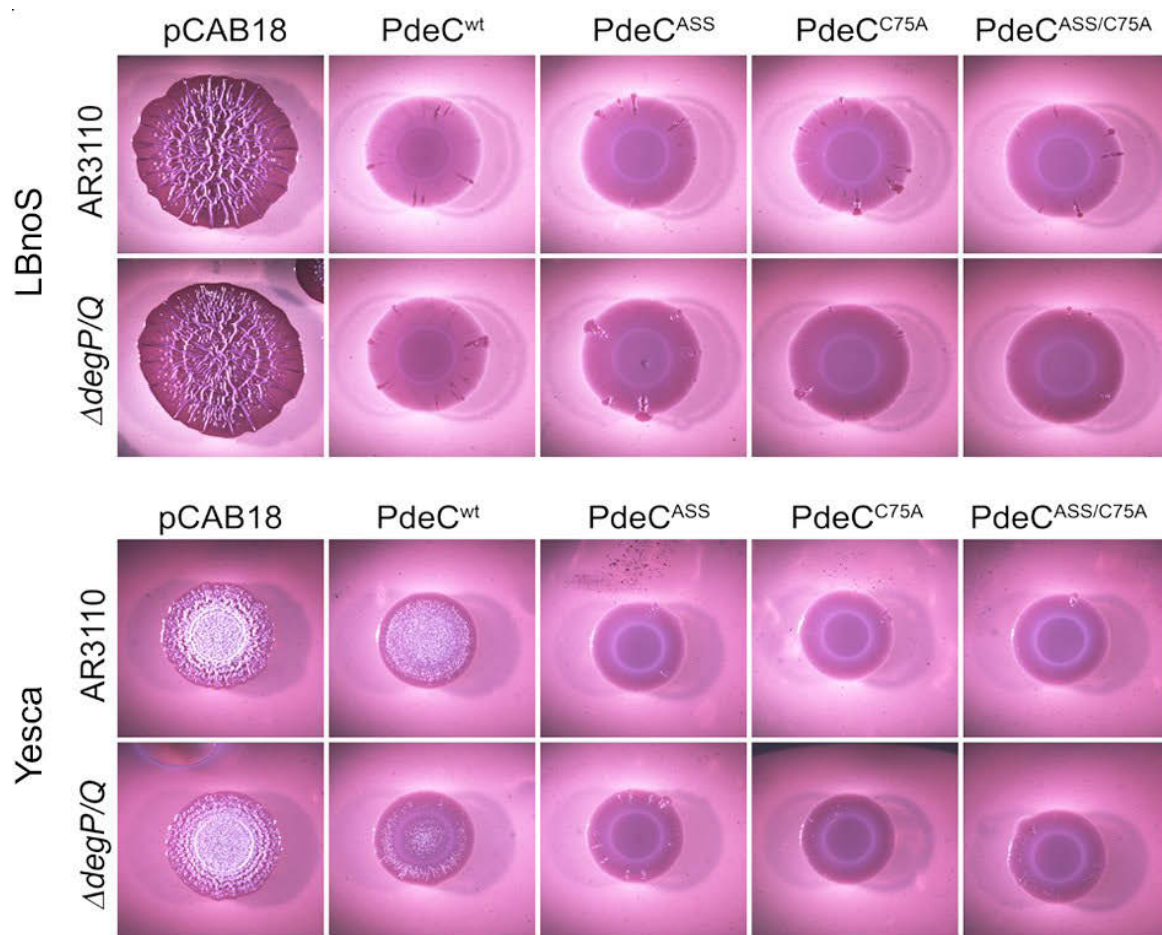
**Abb. 15: DegP und DegQ sind für den Abbau von PdeC verantwortlich.** Immunoblot zur Detektion der 6fach-Histidin-getaggtten pCAB18-Derivate PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF) und PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation) im *E. coli* Stamm W3110 sowie in den Deletionsmutanten  $\Delta degP$ ,  $\Delta degQ$ ,  $\Delta degP \Delta degQ$  und  $\Delta dsbA$ . Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 30  $\mu$ g Gesamtprotein aus, bei 28°C in LB-Medium mit Ampicillin gewachsenen Zellen der postexponentiellen (pe) und der stationären (on = over night) Wachstumsphase.

DegP und DegQ sind also redundant für den Abbau von PdeC<sup>ASS</sup> verantwortlich. Durch die Identifikation, der für den Abbau von reduziertem PdeC verantwortlichen Proteasen konnten nunmehr Zellen generiert werden, welche ausschließlich reduziert PdeC (PdeC<sup>ASS</sup>) in seiner vollständigen Größe exprimierten. Die Frage nach dem ursächlichen Einfluss auf die PDE-Aktivität, die Abwesenheit der Disulfidbrücke oder die darauffolgende Prozessierung, konnte nun anhand von Makrokolonien näher beleuchtet werden.

Dazu wurden alle DSB-defizienten PdeC-Konstrukte und PdeC<sup>wt</sup> in den *degP/degQ*-negativen AR3110 Stamm transformiert und mit dem Wildtyp verglichen (Abb. 16). Alle plasmidkodierte PdeC-Varianten, welche nicht mehr zur Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke befähigt waren und aufgrund der  $\Delta degP/\Delta degQ$ -Mutation im AR3110 Stamm auch nicht dem Abbau zugeführt werden konnten, zeigten einen ähnlich flachen und unstrukturierten Makrokolonie-Phänotyp wie die prozessierten Varianten im Wildtyp-Hintergrund. Dies bedeutet, dass auch die reduzierte nicht abgebaute PdeC-Variante

enzymatische Aktivität besitzt. Die proteolytische Degradierung durch DegP und DegQ ist also eine Konsequenz aus der Abwesenheit der Disulfidbrücke innerhalb der CSS-Domäne, wird aber nicht zur Aktivierung von PdeC benötigt.

Die enzymatische Aktivität von PdeC wird also primär durch den Redoxzustand der CSS-Domäne reguliert, bei der die vermutlich kompaktere Faltung der oxidierten Form inhibierend wirkt. Durch Proteolyse könnte die Gesamtaktivität noch gesteigert werden, da eine irreversibel aktive Form von PdeC generiert würde.



**Abb. 16: Die Proteolyse durch DegP/DegQ ist nicht essentiell für die enzymatische Aktivität der DSB-defizienten PdeC-Derivate.** Untersuchung des Cellulose- und Curli-Fasern-produzierenden Stammes AR3110 sowie der Protease-Doppelmutante AR3110  $\Delta degP/\Delta degQ$ , welche die auf pCAB18 befindlichen PdeC-Derivate: PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF), PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation), PdeC<sup>C75A</sup> (*pdeC* ORF mit C75A Mutation) und PdeC<sup>ASS/C75A</sup> exprimieren. Auf Kongorot- und Ampicillin-haltigen Agarplatten mit LBnoS- oder Yesca-Medium wurden je 5  $\mu$ l einer Übernachtskultur getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt inkubiert.

### 4.3 Beitrag der einzelnen Domänen zu Stabilität und Aktivität von PdeC

PdeC besitzt wie alle anderen in *E. coli* K-12 vorkommenden CSS-PDEs einen sehr spezifischen Domänenaufbau (siehe Abb. 6 A). Es flankieren zwei Transmembrandomänen die ca. 200 Aminosäuren umfassende periplasmatische CSS-Sensordomäne, welche N-terminal an die im Cytoplasma lokalisierte EAL-Domäne gekoppelt ist. Die Abwesenheit der Disulfidbrücke in der CSS-Domäne von PdeC führt zu verstärkter enzymatischer Aktivierung der EAL-Domäne und einem proteolytischen Abbau. Zur Untersuchung des Beitrags jeder einzelnen Domäne zur Aktivität von PdeC wurden verschiedene Derivate mit präzisen Austauschen oder Deletionen von Domänenbereichen mit C-terminalem 6-fachem Histidin-Tag auf pCAB18 kloniert. Untersucht wurde jeweils die Veränderung des proteolytischen Abbaus mittels Immunoblot und die Matrixsynthese mithilfe von Makrokolonien, welche Rückschlüsse auf die PDE-Aktivität zulässt.

Neben den PdeC-Varianten TM2+EAL (beginnend mit S231 nach dem Methionin Startcodon) und EAL (beginnend mit R263 nach den MS(Met-Ser)-Startcodons, wobei das Serin der Proteinstabilität nach der N-End-Rule diene und auch so an dieser Stelle in PdeC vorkommt), welche Tina Jaenicke während ihrer Masterarbeit konstruierte, wurden noch 4 weitere Konstrukte hergestellt und untersucht (Abb. 17) (Mogk et al., 2007). Zum einen wurde eine PdeC-Variante bestehend aus lediglich 1. und 2. Transmembrandomäne sowie EAL-Domäne, also ohne periplasmatische CSS-Domäne, generiert (PdeC<sup>Δperi</sup> = Deletion von T44 bis R234 - Abb. 17 unterstrichen). Zum anderen wurden die Transmembranbereiche 1 und 2 von PdeC durch heterologe Transmembransegmente ähnlicher Hydrophobizität und Orientierung ausgetauscht. Hierzu wurden die in Abb. 17 grau unterlegten Transmembranbereiche 1 und 2 von PdeC gegen die korrespondierenden ebenfalls grau unterlegten Transmembrandomänen 1 und 2 von LacY getauscht (Abb. 17). Dabei entstanden Derivate von PdeC mit lediglich einer veränderten Transmembrandomäne (TM1\* und TM2\*) und solche bei denen beide Membranbereiche ausgetauscht wurden (TM1\*/2\*).

## PdeC

<b>MSHRARH</b> <u>Q</u> LL	ALPGIIFLVL	FPIILSLWIA	FLWAKSEVNN	<b>Q</b> LR <b>T</b> FAQLAL	<b>50</b>
<b>DKSELVIR</b> <b>Q</b> A	DLVSDAAERY	<b>Q</b> GV <b>C</b> TPAHQ	KRMLNIIRGY	<b>L</b> YINELIYAR	<b>100</b>
<b>D</b> NE <b>FL</b> <b>C</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>L</b> I	APVNGYTIAP	ADYKREPVS	IYYRDTPTF	<b>S</b> G <b>Y</b> K <b>M</b> T <b>Y</b> MOR	<b>150</b>
<b>G</b> NYVAVINPL	<b>F</b> WSEVMSDDP	<b>T</b> LQWGVYDTV	<b>T</b> K <b>T</b> TFSL <b>S</b> KE	<b>A</b> SAATFSPLI	<b>200</b>
<b>H</b> LKDLTVORN	<b>G</b> YLYATVYST	<b>K</b> RPIAAIVAT	<b>S</b> YQRLITHFY	<b>N</b> HLIFALPAG	<b>250</b>
<b>I</b> LGSLVLLLL	<b>W</b> L <b>R</b> I <b>R</b> QNYLS	<b>P</b> K <b>R</b> K <b>L</b> Q <b>R</b> ALE	<b>K</b> E <b>Q</b> L <b>C</b> L <b>Y</b> YQ <b>P</b>	<b>I</b> IDIKTEKCI	<b>300</b>
<b>G</b> A <b>E</b> ALLRWPG	<b>E</b> Q <b>G</b> QIMNP <b>A</b> E	<b>F</b> IPLAEKEGM	<b>I</b> EQITDYVID	<b>N</b> VFRDLGDYL	<b>350</b>
<b>A</b> THADRYVSI	<b>N</b> LSASDFETS	<b>R</b> LIARINQKT	<b>E</b> QYAVRPQOI	<b>K</b> FEVTEHAFL	<b>400</b>
<b>D</b> VDKMTPIIL	<b>A</b> FRQAGYEVA	<b>I</b> DDFGIGYSN	<b>L</b> ENLKSLNVD	<b>I</b> LKIDKS <b>F</b> VE	<b>450</b>
<b>T</b> L <b>T</b> HK <b>T</b> SHL	<b>I</b> A <b>E</b> HI <b>I</b> ELAH	<b>S</b> LGLKTIAEG	<b>V</b> ETEEQVNWL	<b>R</b> RGVRYCQ <b>G</b>	<b>500</b>
<b>W</b> FFAKAMP <b>P</b> Q	<b>V</b> FMQWMEQLP	<b>A</b> RELTR <b>G</b> Q			

## LacY

**MYYLK**NTNFW MFG**L**FFFFFYF FIMGAYFPFF PIWL**E**D**I**NEI **S**KSDTGII**F**A  
**A**ISLFSLL**F**Q PLFGLLS**D**KL

**Abb. 17: Aminosäuresequenz von PdeC und TM1 und TM2 von LacY.** Aminosäuresequenz von PdeC (oben) und dem N-terminalen Bereich (AS 1-70) von LacY (unten). Das Startcodon und das stabilisierende Serin an Position 2 von PdeC sowie die Transmembransegmente 1 (TM1\* = N8 - L34) und 2 (TM2\* = G46 - S67) von LacY sind fett gedruckt und grau unterlegt. Die Transmembranbereiche 1 (TM1 = Q8 - A34) und 2 (TM2 = L235 - L262) von PdeC sind grau unterlegt. Der Aminosäurebereich, welcher durch die Deletion der periplasmatischen Schleife eliminiert wurde (PdeC<sup>Δperi</sup>), ist unterstrichen. Die konservierten Cysteine C75 und C106 (innerhalb des CSS-Motivs) sind rot hervorgehoben. Innerhalb der mit blauen Buchstaben gekennzeichneten EAL-Domäne sind das EAL-Motiv sowie weitere Cysteinreste im cytoplasmatischen Teil von PdeC fett hervorgehoben.

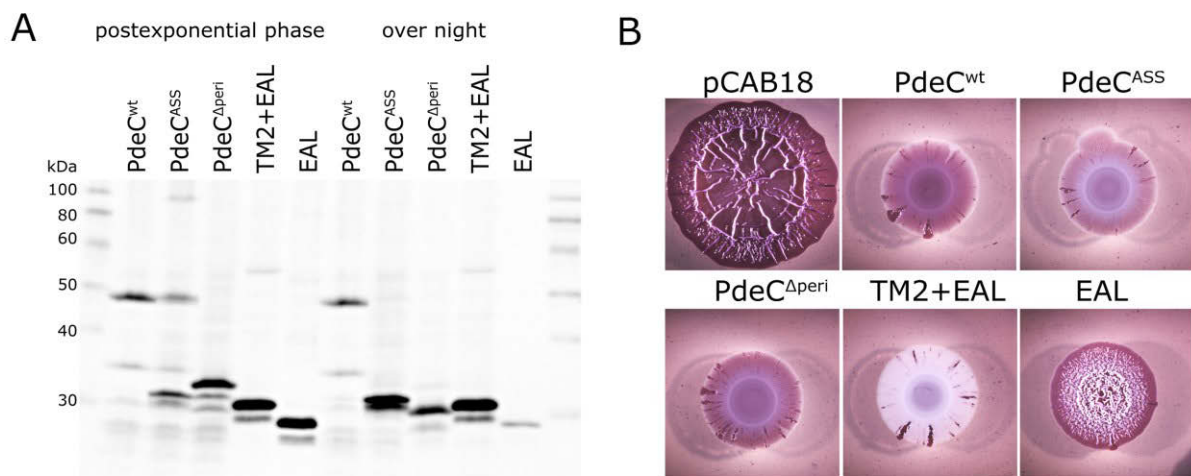
### 4.3.1 Membranintegration durch die TM2-Domäne ist wichtig für die Aktivität von PdeC

Zunächst sollte geprüft werden, ob die Deletionen einzelner Domänen von PdeC im SDS-Gel auch die erwartete Proteingröße aufweisen. Dazu wurden Immunoblots angefertigt und die neu generierten PdeC-Varianten mit den PdeC<sup>wt</sup>- und PdeC<sup>ASS</sup>-Plasmiden hinsichtlich ihrer Laufhöhe im SDS-Gel untersucht. Wie bereits in Abschnitt 4.2.4. erwähnt, befindet sich die prognostizierte Laufhöhe des PdeC TM2+EAL Konstruktes mit C-terminalem 6-fach Histidin-Tag, bei etwa 35,44 kDa. Die Laufhöhen von PdeC<sup>Δperi</sup> und PdeC EAL werden mit 39,79 kDa und 31,85 kDa beziffert (Protein Molecular Weight Calculator - science gateway). Der Immunoblot zeigte, dass alle auf pCAB18 klonierten PdeC-Derivate exprimiert wurden und die erwarteten Bandengrößen aufwiesen (Abb. 18 A). In postexponentiell wachsenden Zellen zeigten alle 3 Konstrukte einen stufenartigen Verlauf hinsichtlich der Größe im Bereich von 30 - 40 kDa, d.h. PdeC<sup>Δperi</sup> lief etwas oberhalb von PdeC TM2+EAL und dieses oberhalb von PdeC EAL, womit die prognostizierten Größendifferenzen im SDS-Gel reflektiert werden konnten. In der postexponentiellen Wachstumsphase wies PdeC<sup>Δperi</sup>



zudem ein Abbaumuster auf, welches teilweise mit dem Abbaumuster der PdeC<sup>ASS</sup>-Variante korrelierte. Dies lässt vermuten, dass trotz der Deletion des periplasmatischen Bereichs von PdeC, die Proteasen DegP und DegQ zu einer proteolytischen Spaltung dieses Konstrukts und somit dem Verlust der 1. Transmembrandomäne führten. Interessanterweise kam es in stationärphasen Zellen über Nacht (hier findet keine *p<sub>tac</sub>*-abhängige Expression der *pdeC*-Gene mehr statt) zu weiterer proteolytischer Degradierung der in diesem Abschnitt untersuchten PdeC-Derivate.

So verschwand das originalgroße PdeC<sup>Δperi</sup>-Protein fast völlig und hinterließ nur eine dünne Bande, welche der Größe nach zu urteilen aus EAL- und 2. Transmembrandomäne bestand. Das PdeC TM2+EAL-Konstrukt zeigte ein Abbauprodukt auf Höhe des PdeC EAL-Domänenproteins, was eine Abspaltung der 2. Transmembrandomäne auf der inneren Seite der Membran nahelegt. Das PdeC EAL-Konstrukt selbst war in der stationären Wachstumsphase nahezu nicht mehr detektierbar, es traten auch keine weiteren Abbauprodukte mehr auf, was auf eine vollständige Degradierung des C-terminal 6fach-Histidin-getaggtten Proteins hinweist.



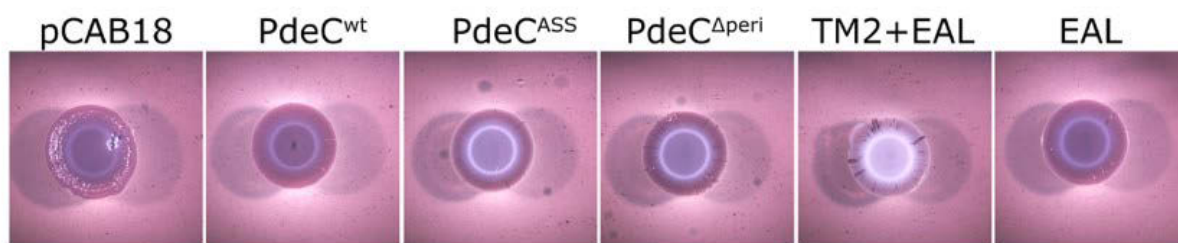
**Abb. 18: Die 2. Transmembrandomäne wird für Stabilität und Aktivität von PdeC benötigt.** Untersuchung der 6fach-Histidin-getaggtten pCAB18-Derivate PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF), PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation), PdeC<sup>Δperi</sup> (PdeC ohne periplasmatischen Domäne), PdeC TM2+EAL (nur 2. Transmembran- sowie EAL-Domäne von PdeC) und PdeC EAL (nur EAL-Domäne). **A)** Immunoblot von bei 28°C in LB-Medium mit Ampicillin gewachsenen Zellen der postexponentiellen und der stationären (on = over night) Wachstumsphase des *E. coli*-Stammes W3110. Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 30 µg bzw. bei TM2+EAL und EAL 3 µg und 1 µg Gesamtprotein. **B)** Untersuchung des Cellulose- und Curli-Fasern-produzierenden Stammes AR3110 mit den entsprechenden Plasmiden auf Kongorot- und Ampicillin-haltigen LBnoS-Agarplatten. Es wurden je 5 µl einer Übernachtskultur getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt inkubiert.

Vergleicht man das Expressionsmuster der PdeC-Konstrukte mit der PDE-Aktivität in Makrokolonien, zeigt PdeC<sup>Δperi</sup> diesbezüglich ein ähnliches Verhalten wie PdeC<sup>ASS</sup>. Was zu der Schlussfolgerung führt, dass PdeC auch ohne periplasmatische CSS-Domäne noch



enzymatische Aktivität besitzen muss (Abb. 18 B). Dies konnte auch auf Yesca-Medium bestätigt werden (Abb. 19). Im Gegensatz zu PdeC<sup>ASS</sup> und PdeC<sup>Δperi</sup>, welche durch eine sehr geringe Matrixproduktion noch minimale Mengen Kongorot binden konnten, fehlte dies in der TM2+EAL-Variante völlig. Somit hatte das PdeC TM2+EAL-Konstrukt einen weitaus drastischeren Einfluss auf die Matrixsynthese, was sich durch die unstrukturierten, komplett weißen Kolonien zeigt. Die EAL-Domäne allein führte nicht zu völlig unstrukturierten Kolonien, hier zeigten sich viele kleine Fältchen. Den Wildtyp mit seiner komplexen 3D-Struktur aus radialen Stegen, welcher hier lediglich das Leerplasmid pCAB18 exprimierte, spiegelte aber auch dieses Konstrukt nicht wieder.

Bis hierhin lässt sich zusammenfassen, dass die TM2-Domäne und somit die Integration in die Membran wichtig für Stabilität und Aktivität von PdeC ist. Während die Präsenz von TM1 direkt stromaufwärts von TM2+EAL, welche sich damit in direkter räumlicher Nähe zueinander befinden, einen eher negativen Effekt auf die enzymatische Aktivität hat.



**Abb. 19: Makrokoloniemorphologie verschiedener PdeC-Varianten in pCAB18 auf Yesca-Medium im AR3110.** Untersuchung des Cellulose- und Curli-Fasern-produzierenden Stammes AR3110 mit den 6fach-Histidin-getaggtten pCAB18-Derivate PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF), PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation), PdeC<sup>Δperi</sup> (PdeC ohne periplasmatischen Domäne), PdeC TM2+EAL (nur 2. Transmembran- sowie EAL-Domäne von PdeC) und PdeC EAL (nur EAL-Domäne) auf Kongorot- und Ampicillin-haltigen Yesca-Agarplatten. Es wurden je 5 µl einer Übernachtskultur getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt inkubiert.

#### 4.3.2 TM1 und TM2 stabilisieren PdeC und schützen somit vor Proteolyse

Das folgende Experiment diente zur Klärung der Fragestellung, ob die Transmembransequenzen TM1 und TM2 lediglich topogene Eigenschaften besitzen und damit nur indirekt die Funktion von PdeC beeinflussen. Das heißt, TM1 könnte als Signalsequenz fungieren und die CSS-Domäne ins Periplasma dirigieren, während TM2 als Transfer-Stop-Sequenz dafür sorgen würde, dass die EAL-Domäne im Cytoplasma verbleibt. Neben diesen grundlegenden Funktionen der Transmembransequenzen wäre auch eine spezifischere Beteiligung dieser Regionen bei der Aktivitätsregulierung von PdeC denkbar. Um dies zu untersuchen, wurden die Transmembranbereiche TM1 und TM2 von PdeC durch die heterologen Segmente TM1\* und TM2\* aus LacY ersetzt (siehe Abschnitt

4.3). Wären die Sequenzen aus PdeC tatsächlich ausschließlich topogener Natur, wäre ein präziser Austausch dieser Regionen mit oben genannten Segmenten gleicher Hydrophobizität und Orientierung ohne eine Beeinträchtigung der redox-regulierten Aktivität möglich.

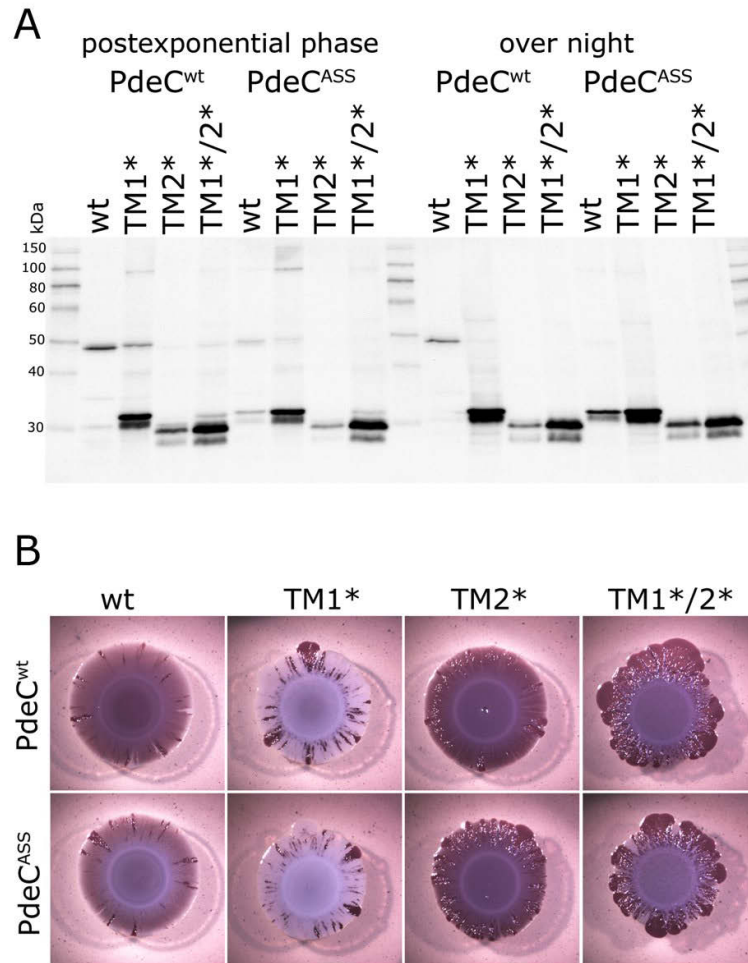
Durch Immunoblot detektiertes PdeC-Wildtyp-Protein, sowie Abbau- und Dimerisierungsmuster wie sie auch bei PdeC<sup>wt</sup> und PdeC<sup>ASS</sup> beobachtet werden können, sprechen für eine korrekte Membraninsertion des PdeC-Konstruktes nach einem TM1\*/TM2\*-Austausch. Allerdings sind diese Proteinbanden schwächer als mit den natürlichen Membrandomänen von PdeC (Abb. 20 A).

Der Austausch von TM1 durch TM1\* führte zu einer Prozessierung des PdeC<sup>wt</sup>-Proteins, die beim Vorhandensein der originalen TM1-Sequenz in der Form lediglich für die periplasmatisch DSB-defizienten PdeC-Varianten detektiert werden konnte (vgl. Abb. 20 A und Abb. 11). Konsistent mit der durch den Abbau stimulierten PDE-Aktivität dieser Variante zeigten auch die Makrokolonien keinerlei Matrixstruktur oder Kongorot-Bindung mehr. Der noch zusätzlich verstärkte reduzierende Effekt auf die extrazelluläre Matrixproduktion in Makrokolonien im Vergleich zu PdeC<sup>ASS</sup> könnte durch erhöhte Proteinmengen dieses PdeC-Konstrukts in der Zelle entstanden sein. Es könnte also geschlussfolgert werden, dass TM1 in PdeC nötig ist um die Disulfidbrücke zwischen beiden konservierten Cysteinen zu stabilisieren. Damit hätte sie eine inaktivierende Wirkung auf die PDE-Aktivität und würde vor der Proteolyse durch DegP und DegQ schützen.

Bei der Substitution von TM2 durch TM2\* entsteht ein weiteres prozessiertes Fragment, welches der Lauflänge der alleinig klonierten EAL-Domäne von PdeC auf pCAB18 entspricht. Neben der Größe zeigt auch die Makrokoloniemorphologie von PdeC TM2\* Ähnlichkeiten mit der von PdeC EAL (vgl. Abb. 20 und Abb. 18). In beiden Kolonien ist wieder verstärkte Kongorot-Bindung zu sehen und auch TM2\*, wenn auch nicht so ausgeprägt wie PdeC EAL, zeigt beginnende geringe Strukturierung durch erhöhte Matrixproduktion. Es ist zu erwähnen, dass in der PdeC TM2\*-Variante mit hoher Wahrscheinlichkeit auch noch aktivere Formen des PdeC-Proteins vorkommen, welche in dem in Abb. 20 A gezeigten Immunoblot schwach zu sehen sind und für eine stärkere Gesamtaktivität im Vergleich zu PdeC EAL in der Makrokolonie führen könnten. Die aktivierende Funktion der originalen 2. Transmembrandomäne von PdeC beinhaltet so möglicherweise eine Inhibierung des proteolytischen Abbaus zwischen TM2 und EAL-Domäne, die zu verminderter PDE-Aktivität führen würde.

Bezüglich der Transmembrandomänen von PdeC kann für TM1 eine indirekte inhibitorische Funktion festgehalten werden, die zur Stabilisierung der periplasmatischen Disulfidbrücke führt und somit vor DegP/DegQ-vermitteltem Abbau schützt. TM2 kommt ebenfalls eine stabilisierende Wirkung zu, jedoch scheint der ausschlaggebende Punkt hier die

Prozessierung innerhalb des Cytoplasmas zwischen TM2- und EAL-Domäne zu sein, die zu einem weniger aktiven löslichen EAL-Fragment führt, welches bei fortschreitendem Wachstum nahezu vollständig degradiert wird.



**Abb. 20: TM1 und TM2 schützen PdeC vor proteolytischem Abbau.** Untersuchung der 6fach-Histidin-getaggten pCAB18-Derivate *PdeC<sup>wt</sup>* (wildtypischer *pdeC* ORF) und *PdeC<sup>ASS</sup>* (*pdeC* ORF mit C106A Mutation), welche die original TM1 und TM2 Sequenzen besitzen (wt) oder dessen 1. bzw. 2. Transmembrandomäne gegen die 1. (TM1\*) und/oder 2. (TM2\*) Transmembrandomäne von LacY ausgetauscht wurden. **A)** Immunoblot von bei 28°C in LB-Medium mit Ampicillin gewachsenen Zellen der postexponentiellen und der stationären (on = over night) Wachstumsphase des *E. coli*-Stammes W3110. Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 40 µg Gesamtprotein. **B)** Untersuchung des Cellulose- und Curli-Fasern-produzierenden Stammes AR3110 mit den entsprechenden Plasmiden auf Kongorot- und Ampicillin-haltigen LBnoS-Agarplatten. Es wurden je 5 µl einer Übernachtskultur getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt inkubiert.

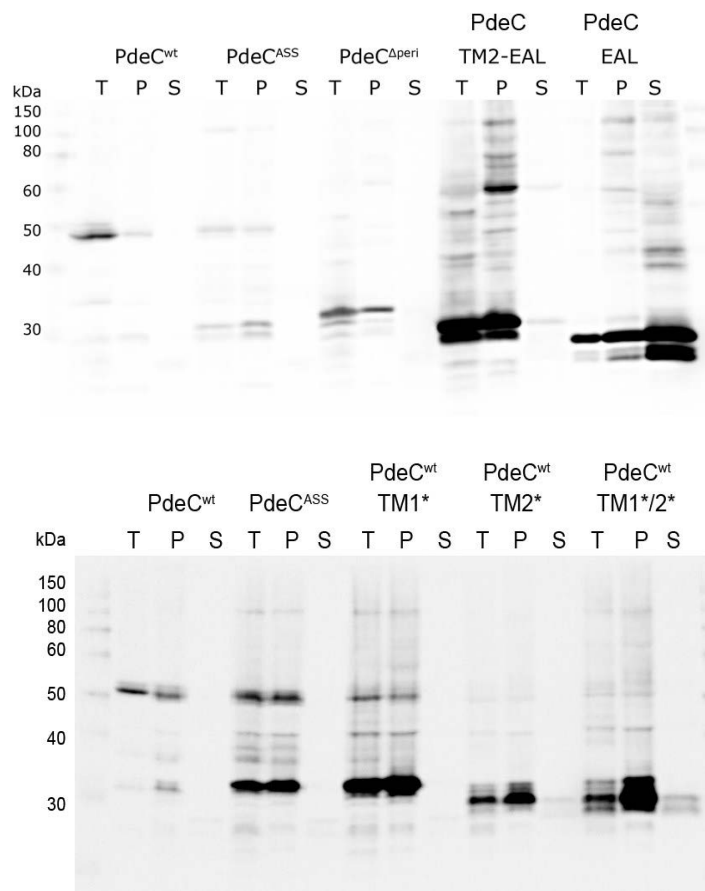
#### 4.3.3 Alle PdeC-Derivate bis auf die lösliche EAL-Domäne sind membrangebunden

Die minimale Voraussetzung eines Proteins, welches in die Membran integriert werden soll, ist das Vorhandensein einer hydrophoben Sequenz von ungefähr 20 Aminosäuren. Diese kann eine Alpha-Helikale-Proteinkette von etwa 3 nm Länge bilden, was in etwa dem Durchmesser des hydrophoben Kerns der Membran entspricht. Die Transmembranregionen flankierend, befinden sich häufig positiv geladene Aminosäurereste im Cytosol, die durch elektrostatische Kräfte zur Membranbindung beitragen können.

Die Translokation des Membranproteins kann das Sec-System erfordern, aber auch unabhängig davon erfolgen. Untersuchungen dazu haben gezeigt, dass bei einer hydrophilen Region, die mehr als 100 Aminosäuren beinhaltet, mit hoher Wahrscheinlichkeit das Sec-System bei der Translokation beteiligt ist (zusammengefasst in Facey and Kuhn, 2004). Aller Voraussicht nach ist dies auch der Fall in PdeC, dessen CSS-Domäne mit ca. 200 Aminosäuren einen sehr großen hydrophilen Bereich zwischen beiden Transmembrandomänen besitzt.

Um zu ermitteln, ob neben dem wildtypischen PdeC-Protein auch alle anderen PdeC-Derivate mit der Membran assoziiert sind bzw. das PdeC EAL-Derivat löslich vorliegt, wurde eine Zellfraktionierung mit NaOH durchgeführt. Dazu wurden 200 µl einer über Nacht bei 28°C gewachsenen Bakterienkultur mit 1ml 0,1 M NaOH versetzt und anschließend abzentrifugiert (Russel and Model, 1982). Diese Methode führte zur Trennung von Membran-assoziierten Proteinen, welche sich im Zellpellet (P) wiederfanden und löslichen Proteinen im Überstand (S = „supernatant“) der zentrifugierten Probe (Abb. 21). Als Kontrolle wurde auch eine unbehandelte Probe aufgetragen (T = „total protein“).

Es zeigte sich, dass alle PdeC-Derivate in der Membranfraktion auftauchten und in der löslichen Fraktion nicht vorzufinden waren, mit Ausnahme der EAL-Domäne. Interessanterweise wurde auch das PdeC TM2+EAL-Fragment in die Membran integriert, ohne dass es der TM1 Signalsequenz bedurfte. Vermutlich geschah dies unabhängig vom Sec-Translokations-System.



**Abb. 21: Lokalisierung aller PdeC-Derivate in Membran-assoziierte oder löslicher Fraktion.** Immunoblot zur Detektion der 6fach-Histidin-getaggten pCAB18-Derivate PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF), PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation), PdeC<sup>Δperi</sup> (PdeC ohne periplasmatischen Domäne), PdeC TM2+EAL (nur 2. Transmembran- sowie EAL-Domäne von PdeC), PdeC EAL (nur EAL-Domäne) (links) sowie von PdeC<sup>wt</sup> und PdeC<sup>ASS</sup>-Derivaten deren 1. bzw. 2. Transmembrandomäne gegen die 1. (TM1\*) und/oder 2. (TM2\*) Transmembrandomäne von LacY ausgetauscht wurde (rechts). Die Plasmide wurden im *E. coli* Stamm W3110 exprimiert und bei 28°C in LB-Medium mit Ampicillin über Nacht inkubiert. Zur Separierung der gesamten Probe (T) in eine lösliche- (S) und Membran-assoziierte (P) Fraktion wurden die Zellen mit NaOH behandelt.

## 4.4 Analysen der PdeC-Derivate zur physiologischen Funktion

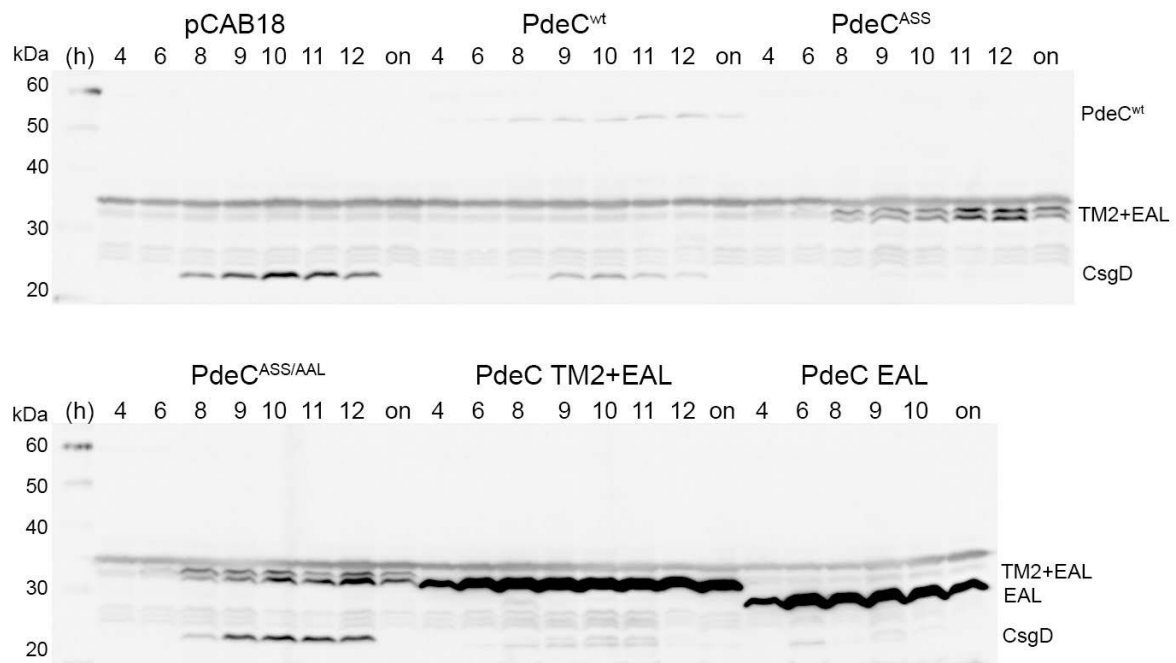
Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass die durch das DsbA/DsbB-System generierte Disulfidbrücke in der CSS-Domäne zu einer Stabilisierung von PdeC führt und es somit vor Proteolyse durch DegP und DegQ geschützt ist. Die Untersuchung von Makrokolonien zeigte außerdem eine geringere Matrixsynthese bei der Expression von PdeC-Varianten, deren CSS-Domänen in einem reduzierten Zustand vorlagen. Die Reduktion der Matrixsynthese dürfte mit potentiell erhöhter PDE-Aktivität der EAL-Domäne von PdeC einhergehen. Dabei scheint der proteolytische Abbau nicht essentiell für die erhöhte PDE-Aktivität von reduziertem PdeC zu sein, sondern eher die Konsequenz aus der Abwesenheit der Disulfidbrücke zwischen C75 und C106. Die phänotypischen Daten aus den Makrokolonieexperimenten sollen im folgenden Kapitel durch weitere Analysen zu den physiologischen Auswirkungen der PdeC-Derivate noch genauer betrachtet und ggf. untermauert werden.

### 4.4.1 PdeC zeigt *in vivo* eine redox-abhängige Repression von CsgD und Curli

Die Ausbildung extrazellulärer Matrixkomponenten in der postexponentiellen Wachstumsphase und so auch in der oberen Schicht eines Makrokolonie-Biofilms unterliegt der c-di-GMP-abhängigen Aktivierung von CsgD. Erhöhte c-di-GMP-Mengen, hervorgerufen durch die RpoS-gesteuerten Zyklasen DgcE und DgcQ, veranlassen PdeR verstärkt seiner enzymatischen Funktion nachzugehen. Daraufhin werden DgcM und MlrA frei und aktivieren die Transkription von CsgD (Lindenberg *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2006). CsgD als zentraler Masterregulator der Biofilmbildung kann dann direkt die Transkription der Curli-Struktureinheiten und indirekt über DgcC die Celluloseexpression aktivieren. Die Curli-Struktureinheiten werden in einem Operon kodiert, an dessen Anfang sich das *csgB*-Gen befindet (Prigent-Combaret *et al.*, 2001; Brombacher *et al.*, 2006).

CsgD-Proteinspiegel und die Expression von *csgB::lacZ*-Reporterfusionen sind daher vortreffliche Indikatoren für veränderte zelluläre c-di-GMP-Konzentrationen. Sollte die verminderte Matrixsynthese bei DSB-defizienten PdeC-Derivaten tatsächlich über erhöhte PDE-Aktivität und daher reduzierte c-di-GMP-Spiegel erfolgen, sollten auch CsgD-Spiegel und *csgB::lacZ*-Expression unter diesen Bedingungen sinken. Zur Untersuchung der CsgD-Proteinspiegel wurde ein CsgD-spezifischer Antikörper benutzt, welcher auf der Basis eines mit 6fach-His-Tag gereinigten CsgD-Proteins hergestellt wurde und demnach auch andere Proteine bindet, welche eine 6fache Histidin-Sequenz tragen. Daher zeigt Abbildung 19 nicht nur die CsgD-Proteinmengen von *E. coli* K-12 W3110 entlang der Wachstumskurve bei

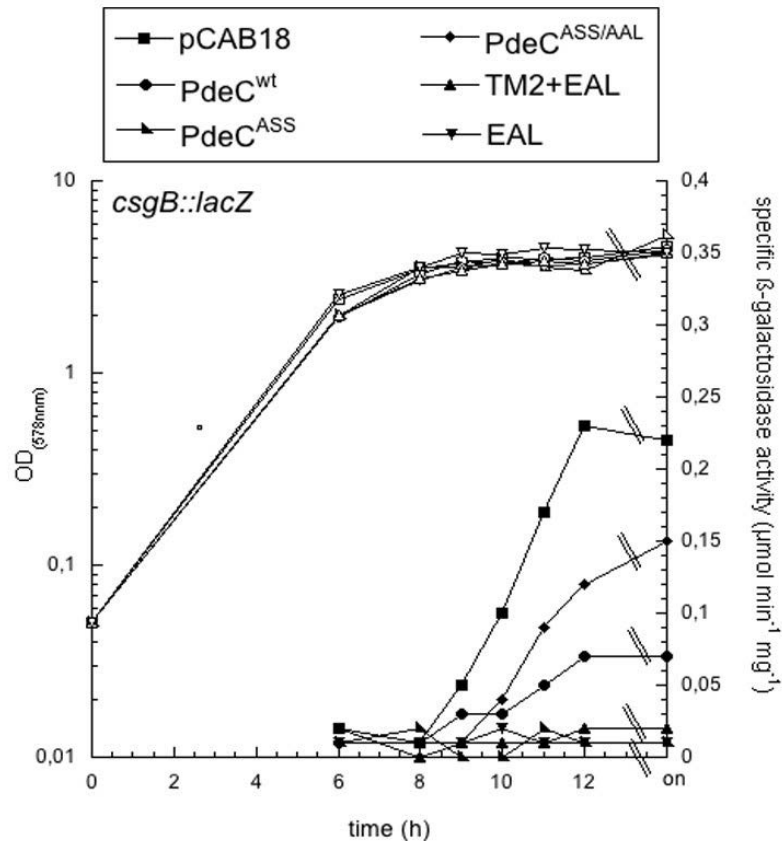
28°C in LB-Medium mit Ampicillin, sondern auch die darin exprimierten PdeC-Protein-Derivate mit Histidin-Tag. In Abbildung 20 wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des W3110  $\Delta lac(I-A)$  Stammes mit *csgB::lacZ*-Reporterfusion und den von pCAB18 exprimierten PdeC-Derivaten, ebenfalls bei 28°C entlang der Wachstumskurve in LB-Medium mit Ampicillin untersucht.



**Abb. 22: DSB-defiziente PdeC-Varianten führen zu stark verminderten CsgD-Proteinmengen.** Immunoblot zur Detektion der CsgD-Proteinmengen sowie der 6fach-Histidin-getaggten pCAB18 Derivate PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF), PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation), PdeC<sup>ASS/AAL</sup> (*pdeC* ORF mit C106A und E303A Mutation), PdeC TM2+EAL (nur 2. Transmembran- sowie EAL-Domäne) und PdeC EAL (nur EAL-Domäne). Die Probennahme im *E. coli* Stamm W3110 erfolgte bei 28°C entlang des Wachstums in LB-Medium mit Ampicillin. Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 10 µg Gesamtprotein. Der Proteinnachweis erfolgte mit einem CsgD-spezifischen Antikörper, welcher ebenso Histidinketten erkennt.

Bei der Verwendung des CsgD-Antikörpers wurde das pCAB18-Leerplasmid als Kontrolle im Versuchsverlauf mitgezogen. CsgD ist ein lösliches etwa 25 kDa großes Protein und erschien auf erwarteter Höhe entsprechend seiner RpoS-abhängigen Expression (siehe Abschnitt 1.3.2). Während Zellen exponentiellen Wachstums (4-6 h) noch keine messbaren CsgD-Spiegel zeigten, stieg die Menge des Proteins in der postexponentiellen Phase an und erreichte nach 10 h ihren Höhepunkt (Abb. 22).

Da sich die Existenz von CsgD-Protein in der Zelle direkt auf die Transkription des *csgBAC*-Operon auswirkt, zeigte die Expression der *csgB::lacZ*-Fusion einen ähnlichen Verlauf entlang der Wachstumskurve (Abb. 23).



**Abb. 23: DSB-defiziente PdeC-Varianten führen zu stark verminderter Curli-Expression.** Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterfusion mit den PdeC-Derivaten PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF), PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation), PdeC<sup>ASS/AAL</sup> (*pdeC* ORF mit C106A und E303A Mutation), PdeC TM2+EAL (nur 2. Transmembran- sowie EAL-Domäne) und PdeC EAL (nur EAL-Domäne) in LB-Medium mit Ampicillin bei 28°C entlang der Wachstumskurve. Offene Symbole zeigen die optische Dichte (OD<sub>578</sub>) und geschlossene Symbole die spezifische β-Galaktosidase-Aktivität. Die Probennahme des Wertes für die Messung über Nacht (on) erfolgte nach ca. 28 h.

Die weitere Analyse der Daten zeigte diese direkte Korrelation von CsgD-Proteinspiegel und *csgB::lacZ*-Expression in allen untersuchten PdeC-Derivaten. PdeC<sup>wt</sup>-exprimierende Zellen zeigten folglich, im Vergleich zum Leerplasmid-tragenden Stamm, einen Abfall von CsgD-Menge und *csgB::lacZ*-Expression. Diese Reduktion konnte durch die Verwendung des PdeC<sup>ASS</sup>-Plasmids deutlich gesteigert werden, so dass keine detektierbaren Mengen an CsgD mehr vorlagen, was auch die *csgB::lacZ*-Fusion widerspiegelte. Die Verwendung der Plasmide PdeC TM2+EAL und PdeC EAL führte zu PdeC<sup>ASS</sup>-ähnlichen Resultaten, d.h. auch hier fand keine Expression von CsgD oder *csgB::lacZ* mehr statt. Der Immunoblot zeigte jedoch auch, dass die PdeC-Fragmente TM2+EAL und EAL in wesentlich höheren Proteinkonzentrationen in der Zelle vorlagen, als es für die anderen hier untersuchten PdeC-Derivate der Fall war. Daher kann an diesem Punkt keine Aussage über eine verstärkte Aktivität dieser Derivate gemacht werden, da allein die erhöhte Proteinmenge für den drastisch reduzierenden Effekt dieser Matrix-bildenden Komponenten verantwortlich sein



könnte. Das Plasmid, welches neben der C106A(ASS)-Mutation auch eine E303A(AAL)-Mutation aufwies und somit eine enzymatisch inaktive Variante darstellt, konnte den Effekt des PdeC<sup>ASS</sup>-Plasmids nahezu vollständig wieder aufheben. Es ist demnach davon auszugehen, dass erhöhte PDE-Aktivität in der PdeC<sup>ASS</sup>-Variante zu dem negativen Einfluss auf die Matrix-bildenden Komponenten CsgD und CsgB führt.

Die hier angestellten Untersuchungen stützen demnach die Annahmen aus den Makrokoloniedaten und zeigen eine deutlich enzymatisch aktivere PdeC<sup>ASS</sup>-Variante verglichen mit dem Wildtyp-Protein.

#### 4.4.2 Der Einfluss von DsbA und DegP/DegQ auf die Expression von CsgD und Curli

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass das DSB-System und die HtrA-Proteasen DegP und DegQ an der Stabilität und Funktion von PdeC beteiligt sind. DsbA als primäre Oxidoreduktase im Periplasma oxidiert die konservierten Cysteine in der CSS-Domäne von PdeC. Somit wird PdeC nicht nur vor DegP/Q-vermitteltem Abbau geschützt, es wird außerdem die Reduktion der CSS-Domäne verhindert, die zu einer erhöhten Enzymaktivität führen würde. Diese erhöhte Aktivität könnte dann die Matrixsynthese durch verringerte c-di-GMP Mengen negativ beeinflussen. Folglich wäre zu vermuten, dass eine  $\Delta dsbA$ -Mutante, aufgrund von vermehrt in der reduzierten Form vorliegenden PdeC-Proteins, zu verminderter Matrixsynthese führt. In Makrokolonien würde dies eine reduzierte Rotfärbung und/oder Strukturierung bedeuten (siehe Abb. 7). Gegensätzlich dazu wurde jedoch beobachtet, dass eine  $\Delta dsbA$ -Mutante zu stärkerer Rotfärbung und großflächigen, aufgefalteten Makrokolonie-Biofilmen in *E. coli* führt, was eine stark erhöhte Matrixproduktion bedeutet (Hufnagel *et al.*, 2014).

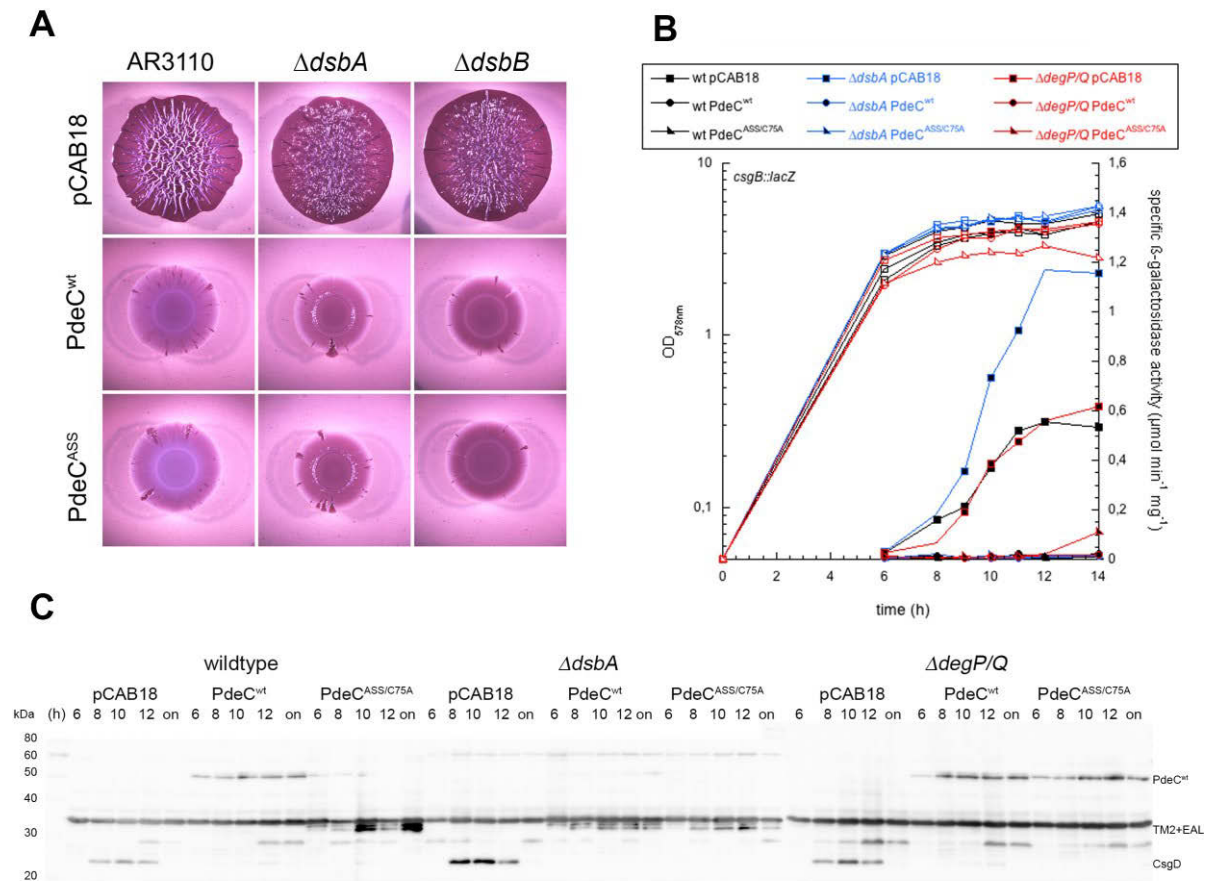
In diesem Experiment sollte demnach der Einfluss einer  $\Delta dsbA$ -Mutante auf die Expression von CsgD und Curli untersucht werden, sowie der Makrokolonie-Phänotyp aus der Arbeit von Hufnagel *et al.* reproduziert werden. Weiterhin sollte in dieser Mutante der Einfluss von wildtypischem PdeC und konstant reduziertem PdeC, exprimiert von pCAB18, im Hinblick auf CsgD- und Curli-Expression sowie Makrokoloniemorphologie untersucht werden.

Bezüglich der Mutation von DsbA und DsbB zeigte sich in Makrokolonien des Curli- und Cellulose-produzierenden AR3110 Stammes bereits ein Einfluss auf die Struktur der Kolonie bei der Verwendung des Leerplasmids. Die Kolonien waren größer, dunkler und mit lediglich kleinen Fältchen durchzogen. Hohe sich auftürmende Falten wie im Wildtyp-Stamm konnten nicht mehr beobachtet werden (Abb. 24 A). Die Expression der PdeC-Plasmide führte auch in diesen Stammhintergründen zu einer deutlichen Reduktion der Koloniestruktur. Die  $\Delta dsbB$ -Mutanten mit den PdeC<sup>wt</sup> und PdeC<sup>ASS</sup> zeigten eine flache und im Vergleich zum

AR3110 Wildtyp dunklere Rotfärbung, während die  $\Delta dsbA$ -Mutanten etwas heller schienen und zentral eine beginnende Ringstrukturierung aufwiesen. Ein Unterschied zwischen der DSB-defizienten PdeC<sup>ASS</sup>- und der PdeC<sup>wt</sup>-Variante im *dsbA*- oder *dsbB*-negativen Hintergrund in den Makrokolonien wurde nicht ersichtlich. Bei dem Vergleich der CsgD-Spiegel und der Expression von *csgB::lacZ* zeigte sich, dass die Deletion des *dsbA*-Gens zu einem Anstieg beider Indikatoren für Matrixsynthese führte (Abb. 24 BC). Sowohl erhöhte CsgD-Protein Spiegel als auch erhöhte *csgB::lacZ*-Expression könnten demnach die Ursache für die veränderte Koloniemorphologie von AR3110  $\Delta dsbA$  und  $\Delta dsbB$  sein, die durch ihre starke Rotfärbung und daher vermehrte Kongorot-Bindung bereits auf erhöhte Matrixsynthese hindeutete. Während mit dem PdeC<sup>wt</sup>-Plasmid im AR3110 Wildtyp-Hintergrund noch geringe Mengen an CsgD-Protein sowie *csgB::lacZ*-Expression sichtbar wurden, konnte dies bei PdeC<sup>ASS/C75A</sup> nicht mehr detektiert werden (siehe dazu vgl. Abb. 22). Die Auswertung des Immunoblots zeigte in der  $\Delta dsbA$ -Mutante mit PdeC<sup>wt</sup>-Plasmid hingegen kein CsgD-Protein, womit sich diese Zellen ähnlich dem AR3110 Wildtyp mit der PdeC<sup>ASS/C75A</sup>-Variante verhielten. Aufgrund der generell sehr geringen *csgB::lacZ*-Expression der Stämme mit den plasmidkodierten PdeC-Derivaten konnte in diesem Experiment kein Unterschied zwischen PdeC<sup>wt</sup> in der  $\Delta dsbA$ -Mutante verglichen mit dem Wildtyp-Stamm festgestellt werden.

Aus der Analyse von Makrokolonien ging hervor, dass eine nicht prozessierte reduzierte Form von PdeC (PdeC<sup>ASS</sup> in AR3110  $\Delta degP/Q$ ) auch stark aktiv ist und die Matrixsynthese drastisch reduziert (Abb. 16). Es wurde jedoch verstärkt die Dimerisierung der Einzel-Cystein-Varianten von PdeC beobachtet (Abb. 15). Unter Ausschluss dieser, womöglich in der Zelle so nicht vorkommenden Dimerisierung, sollte in der Doppel-Cystein-Mutante PdeC<sup>ASS/C75A</sup> sowie im PdeC-Wildtyp der Einfluss der  $\Delta degP/Q$ -Mutante auf CsgD-Proteinmengen und *csgB::lacZ*-Expression untersucht werden. Es sollte der generelle Einfluss der Protease-Doppelmutante auf die Expression untersucht und die Proteolyse, ohne Einfluss der Dimerisierung, als Aktivierungsmechanismus von PdeC ausgeschlossen werden. Die Deletion der Proteasen DegP und DegQ, mit und ohne PdeC-Plasmiden, führte unter den hier untersuchten Bedingungen jedoch zu keinen Veränderungen der CsgD-Proteinmenge oder der *csgB::lacZ*-Expression.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Proteasen DegP und DegQ keinen Einfluss auf die CsgD- und Curli-Expression haben. Das Fehlen von DsbA hingegen erhöht sowohl die Expression von CsgD als auch von Curli und verändert somit nachweislich die Matrixsynthese. Die vom Plasmid-exprimierten PdeC-Varianten PdeC<sup>wt</sup> und PdeC<sup>ASS</sup> können diese vermehrte Matrixsynthese jedoch wieder eliminieren. Aussagen über spezifische Aktivitäten sind in diesem Zusammenhang nicht möglich da DsbA pleiotrop, d.h nicht nur über die CSS-PDEs Einfluss auf CsgD und Curli nehmen kann.



**Abb. 24: Der Effekt von DsbA und DegP/Q auf die Expression von CsgD und Curli.** **A)** Auf Kongorot- und Ampicillin-haltigen LBnoS-Agarplatten wurden je 5  $\mu\text{l}$  einer Übernachtskultur des *E. coli* K-12 Stammes getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt inkubiert. Untersucht wurde der Cellulose- und Curli-Fasern-produzierende Stamm AR3110 sowie die Mutanten  $\Delta dsbA$  und  $\Delta dsbB$ , welche die auf pCAB18 befindlichen PdeC-Derivate PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF), und PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation) exprimierten. **B)** Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterergenfusion im W3110 Wildtyp Hintergrund sowie in den Mutanten  $\Delta dsbA$  und  $\Delta degP/\Delta degQ$  mit den unter **C)** verwendeten PdeC-Derivaten in LB-Medium mit Ampicillin bei 28°C entlang der Wachstumskurve. Offene Symbole zeigen die optische Dichte (OD<sub>578</sub>) und geschlossen Symbole die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Probennahme des Wertes für die Messung über Nacht (on) erfolgte nach ca. 28 h. **C)** Immunoblot zur Detektion der CsgD-Protein Spiegel sowie der 6fach-Histidin-getaggt pCAB18 Derivate PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF), PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation) und PdeC<sup>ASS/C75A</sup> (*pdeC* ORF mit C75A und C106A Mutation). Die Probennahme in den *E. coli* Stämmen W3110 Wildtyp,  $\Delta dsbA$  und  $\Delta degP/\Delta degQ$  erfolgte bei 28°C entlang des Wachstums in LB-Medium mit Ampicillin. Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein. Der Proteinnachweis erfolgte mit einem CsgD-spezifischen Antikörper, welcher ebenso Histidinketten erkennt.

#### 4.4.3 Untersuchung der enzymatischen Aktivität der PdeC-Derivate *in vitro*

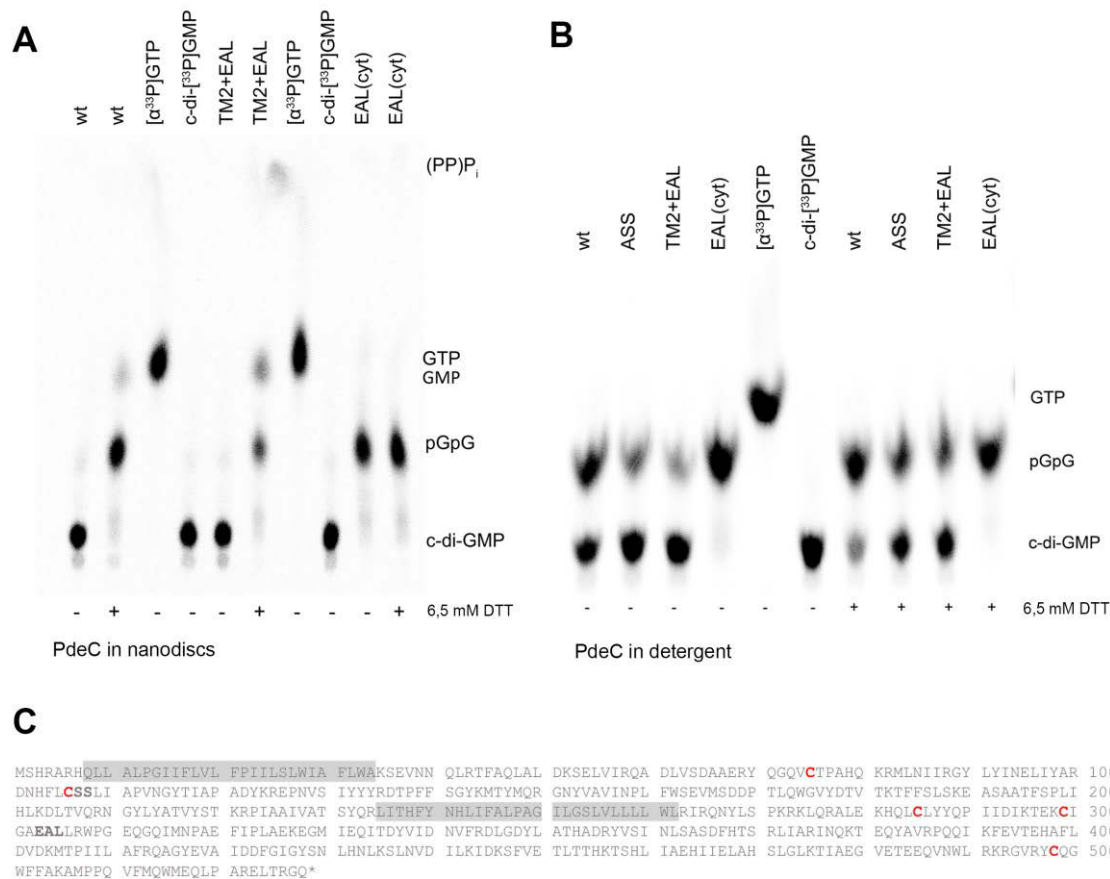
Bereits die Aminosäuresequenz von PdeC lässt auf einen potentiellen Abbau von c-di-GMP, durch dessen EAL-Domäne, schließen. Das Vorhandensein der hochkonservierten Aminosäuren sowie des konservierten EAL-Motivs lassen vermuten, dass PdeC mit hoher Wahrscheinlichkeit als Phosphodiesterase aktiv ist (siehe Abschnitt 4.2). Aus den bis hierhin angestellten Untersuchungen wird dazu außerdem deutlich, dass PdeC und insbesondere

die reduzierte Form einen Einfluss auf diverse durch c-di-GMP-regulierte Prozesse hat. So wurde eine deutliche Reduktion der Matrixsynthese in Makrokolonien durch PdeC, exprimiert von einem Niedrigkopien-Vektor sichtbar, was auf verringerte c-di-GMP-Spiegel schließen lässt. Hinzu kommt die Reduktion der matrixbildenden Komponenten CsgD und Curli. Auch in diesem Fall zeigt sich, dass die reduzierte PdeC<sup>ASS</sup>-Form deutlich stärker zur Erniedrigung der CsgD-Spiegel und der Expression der *csgB::lacZ*-Fusion beiträgt. Erhärtet wird die Annahme von stark enzymatisch aktivem PdeC durch den Austausch des funktionalen EAL-Motivs durch ein AAL-Motiv, was in jedem Fall die wildtypische Situation wiederherstellt. Die *in vivo* Daten belegen demnach eine PDE-Aktivität von PdeC, die durch die Bildung einer Disulfidbrücke über die konservierten Cysteine der CSS-Domäne unterbunden werden kann.

Das folgende Experiment soll zeigen, ob PdeC die Aktivität besitzt c-di-GMP *in vitro* abzubauen und dies in Abwesenheit der DSB geschieht. Dazu wurden die PdeC-Derivate PdeC<sup>wt</sup>, PdeC TM2+EAL, PdeC EAL und PdeC<sup>ASS</sup> überproduziert und mittels 6fachem Histidin-Tag über eine Ni-NTA-Säule gereinigt. Die Reinigung erfolgte in allen Fällen ohne Verwendung von Reduktionsmitteln in sämtlichen Puffern und mit DDM als Detergenz. Durch Größenausschlusschromatographie wurde im Fall von PdeC<sup>ASS</sup> dafür gesorgt, dass lediglich die abgebaute Bande in der Proteinlösung vorlag. Die Aktivitäten der Proteine wurden für PdeC EAL in Glycerin-haltigem Puffer und für PdeC<sup>wt</sup> und TM2+EAL in Detergenzlösung oder Nanodiscs untersucht.

In Nanodiscs wird die membranöse Umgebung der Proteine aufrechterhalten, indem eine Doppellipidschicht durch zwei Gürtelproteine stabilisiert wird. In diesem Konstrukt befinden sich anschließend quantifizierbare Mengen des Proteins von Interesse (Bayburt and Sligar, 2010; Catoire et al., 2014). Zur Inkorporation von PdeC wurde, durch die Verwendung des Gürtelproteins MSP1D1, eine Disc mit circa 9,7 nm Durchmesser erzeugt. Die Quantifizierung von Gürtelprotein und PdeC-Derivat ergab ein Verhältnis von 1:2,07 (PdeC:MSP1D1) im Fall von PdeC<sup>wt</sup> und 1:2,16 bei der PdeC TM2+EAL-Variante. Dies lässt bei 2 Gürtelproteinen pro Nanodisc darauf schließen, dass jeweils ein PdeC Wildtypprotein sowie auch ein TM2+EAL Proteinfragment in eine Nanodisc integriert wurden (siehe Material und Methoden). Die Messung der PDE-Aktivität erfolgte durch die Inkubation von gereinigtem Protein mit radioaktiv markiertem [<sup>33</sup>P]-c-di-GMP und einer anschließenden Auftrennung auf einer Dünnschichtchromatographieplatte.

Um den Effekt der Reduktion von Disulfidbrücken (insbesondere C75 und C106) auf die Aktivität der PdeC-Derivate zu untersuchen, wurden einige Proben mit dem Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) versetzt.



**Abb. 25: *In vitro* Aktivitätsanalysen von PdeC und PdeC-Derivaten.** **A)** Wildtypisches PdeC und das TM2+EAL-Fragment in Nanodiscs sowie das lösliches EAL-Fragment in Puffer wurden mit einer Endkonzentration von 0,25 μM mit 16,5 nM [<sup>33</sup>P]-c-di-GMP (3000 Ci/mmol) 60 min bei 30°C inkubiert und mit EDTA abgestoppt. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Dünnschicht-Chromatographie. Als Kofaktor wurde 10 mM MgCl<sub>2</sub> in jeden Ansatz bis auf EAL(cyt) gegeben. Zur Kontrolle wurde [α<sup>33</sup>P]-GTP aufgetragen. Als Reduktionsmittel wurde 6,5 mM DTT in die entsprechenden Ansätze pipettiert. **B)** Wildtypisches PdeC, das Abbaufragment von PdeC<sup>ASS</sup> und das TM2+EAL-Fragment in Detergenz (DDM) sowie das lösliches EAL-Fragment in Puffer wurden mit einer Endkonzentration von 0,52 μM mit 16,5 nM [<sup>33</sup>P]-c-di-GMP 60 min bei 30°C inkubiert und mit EDTA abgestoppt. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Dünnschicht-Chromatographie. Als Reduktionsmittel wurde 6,5 mM DTT in die entsprechenden Ansätze pipettiert. **C)** Aminosäuresequenz von PdeC. Die Transmembranbereiche 1 (TM1 = Q8 - A34) und 2 (TM2 = L235 - L262) sind grau unterlegt. Die konservierten Cysteine C75 und C106 (innerhalb des CSS-Motivs) sowie 3 weitere Cysteinreste im cytoplasmatischen Teil von PdeC (C285, C299 und C498) sind rot hervorgehoben. CSS- und EAL-Motiv sind fett gedruckt.

Zunächst zeigte sich, dass die cytoplasmatische EAL-Domäne allein fähig war c-di-GMP in das Abbauprodukt pGpG umzusetzen (Abb. 25 A und B). In Abbildung 20 A wurde weiterhin wildtypisches PdeC (PdeC-ND) und TM2+EAL-Fragment (TM2+EAL-ND) integriert in Nanodiscs untersucht. Während die lösliche EAL-Domäne unabhängig vom Redoxzustand (+/- DTT) c-di-GMP zu pGpG degradierte, zeigten PdeC-ND und TM2+EAL-ND unter oxidierten Bedingungen keinerlei Aktivität (Abb. 24 A). Erst die Zugabe des Reduktionsmittels führte zum Abbau von c-di-GMP. Die membranständigen in Nanodisc befindlichen PdeC-Derivate zeigten im reduzierten Zustand außerdem eine effektivere

Hydrolyse von c-di-GMP, bei der sogar das Abbauprodukt GMP und in den TM2+EAL-ND einzelne Phosphate detektiert werden konnten. Folglich kommt es durch die Membranbindung zunächst zu einer Inhibierung der PDE-Aktivität, die durch Reduktion wieder aufgehoben werden kann, bzw. die Aktivität sogar noch verstärkt.

Da auch das TM2+EAL-Fragment auf die Redoxveränderungen reagierte, scheinen hier nicht nur die konservierten Cysteine der CSS-Domäne im Periplasma beteiligt zu sein. PdeC besitzt 3 weitere Cysteine im cytoplasmatischen Teil des Proteins, die potentiell ebenfalls durch DTT reduziert werden können (Abb. 25 C). Da die lösliche EAL-Domäne andererseits keinen Redoxeffekt zeigt, obwohl auch sie die 3 Cysteine besitzt lässt vermuten, dass die Integration in die membranöse Umgebung der Nanodisc durch die TM2 für den Redoxeffekt verantwortlich ist. Nichtsdestotrotz scheint die Anwesenheit des periplasmatischen Teils und der 1. Transmembrandomäne zu einer verminderten Aktivität der PdeC<sup>wt</sup>-Variante im Gegensatz zum TM2+EAL Fragment in Nanodisc zu führen.

Alle in Detergenz befindlichen PdeC-Derivate zeigen hingegen auch ohne Reduktion der Disulfidbrücken durch DTT Aktivität beim Abbau von c-di-GMP (Abb. 25 B). Diese Aktivität ist im Vergleich zu den reduzierten ND-Varianten eher schwach und beinhaltet lediglich den Abbau zu dem Zwischenprodukt pGpG. Durch die Zugabe von DTT konnte jedoch auch hier die PDE-Aktivität gesteigert werden. Besonders bei PdeC<sup>wt</sup> war nach der Zugabe des Reduktionsmittels nur noch sehr wenig c-di-GMP sichtbar, während die Menge an pGpG stark anstieg. Für PdeC<sup>ASS</sup> und TM2+EAL war der Redoxeffekt weniger stark ausgeprägt und noch hohe Mengen an unabgebautem c-di-GMP wurden detektiert.

Abschließend ist zu sagen, dass unter diesen Bedingungen *in vitro* keine Aussage über die Redoxregulation von PdeC über die konservierten Cysteine in der periplasmatischen Domäne getroffen werden kann. Die cytoplasmatischen Cysteine der EAL-Domäne sind *in vivo* anderen eher reduzierenden Redoxbedingungen ausgesetzt als die periplasmatische CSS-Domäne. Daher müssen beide Domänen in diesem Hinblick getrennt voneinander betrachtet werden. Realisierbar wäre dies beispielsweise mit einem Austausch der cytoplasmatischen Cysteine in der EAL-Domäne von PdeC durch eine redoxunabhängige Aminosäure wie Alanin. Wäre dieses Konstrukt stabil und als PDE aktiv, könnte man mit der Zugabe von Reduktionsmittel spezifisch das verbliebene konservierte Cysteinpaar der CSS-Domäne reduzieren und den Abbau von c-di-GMP unter beiden Redoxbedingungen vergleichen.

## 4.5 Redox-relevante Umweltbedingungen verändern die extrazelluläre Matrixbildung

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von redox-relevanten Stimuli mit Hinblick auf die extrazelluläre Matrixsynthese und die Identifizierung potentieller DGCs oder PDEs welche an dieser Reaktion beteiligt sein könnten. Hierzu wurde zum einen der Einfluss von Licht und zum anderen die Reaktion auf Eisen getestet. Als Indikatoren für daraus resultierende veränderte c-di-GMP-Spiegel dienten die Morphologie von Makrokolonien, die Proteinmenge des globalen Regulators der Matrixsynthese CsgD und die Expression der durch CsgD-regulierten Gene *csgB* und *dgcC* anhand von Reporter-genfusionen. Zudem wurde auch die Expression von PdeC mithilfe von gemessenen Proteinmengen und Reporter-genfusionen unter den verschiedenen Bedingungen untersucht.

### 4.5.1 Reaktion auf Licht

Licht im Zusammenspiel mit Sauerstoff kann durch das Entstehen reaktiver Sauerstoffspezies vermehrt zu Oxidationsreaktionen führen. In diesem Abschnitt sollte der generelle Einfluss von Licht auf das Wachstum von Makrokolonien untersucht und eine mögliche Einflussnahme von c-di-GMP-modulierenden Enzymen ermittelt werden. In nachfolgend dargelegten Experimenten wurde der Lichteinfluss daher auf mehreren Ebenen untersucht. Die phänotypische Analyse von Makrokolonien aller GGDEF-EAL-Mutanten in *E. coli* K12 sollte Hinweise auf Lichtstress-bedingte Veränderungen der Matrixproduktion und die Einflussnahme von DGCs und PDEs auf diese liefern. Außerdem wurde die Transkription der an der Matrixsynthese beteiligten Gene *dgcC* und *csgB* sowie von *pdeC* selbst mittels *lacZ*-Reporter-genfusion bestimmt. Immunoblots dienten der Ermittlung veränderter CsgD- und PdeC-Proteinmengen in der Zelle unter Lichteinfluss. Als Lichtquelle diente eine handelsübliche zur Aufzucht von Pflanzen und Fischen genutzte Tageslichtlampe mit 11 Watt und 900 Lumen. Für den Makrokolonien-Assay wurde der Curli- und Cellulose-produzierende *E. coli* Stamm AR3110 für 5 Tage konstant der Lichtquelle ausgesetzt, welche sich ca. 18,5 cm über der Agarplatte befand. Kontrollplatten wurden 5 Tage in völliger Dunkelheit inkubiert. Die Probenentnahme für den Immunoblot-Assay und die Messung der Reporter-genfusion erfolgte ebenfalls aus Makrokolonien. Diese wurden 24h mit oder ohne Lichteinstrahlung inkubiert, die entstandene Kolonie von der Platte gekratzt und sorgfältig resuspendiert. Da bei der Resuspension der Zellen und für die Bestimmung der optischen Dichte sowie der anschließenden Gesamtproteinbestimmung

vermehrte Matrixproduktion hinderlich wäre, wurden diese Experimente im Cellulose-negativen W3110 Stamm durchgeführt.

#### 4.5.1.1 Lichteinwirkung reduziert die CsgD-Expression und somit die Synthese von Matrixkomponenten

Um einen ersten Einblick auf die Reaktion von Curli- und Cellulose-produzierenden *E. coli* Zellen auf Lichtstress zu bekommen, wurde zunächst die Makrokoloniemorphologie von AR3110 mit und ohne Lichtbestrahlung dokumentiert (Abb. 27 A, jeweils links oben). Bei den in Dunkelheit inkubierten Kolonien zeigte sich bei 5 Mutanten eine deutlich sichtbare Veränderung der Morphologie verglichen mit dem Wildtyp AR3110. Diese Unterschiede wurden bereits in der Dissertation von Anja Richter aufgezeigt.  $\Delta dgcC$ ,  $\Delta dgcE$  und  $\Delta dgcM$  zeigten einen reduzierenden Einfluss auf die Synthese von Matrix anhand kleiner, weniger strukturierter Biofilme. Die Deletionen von *pdeH* und *pdeR* führten zu einem Anstieg der Produktion, verbunden mit großflächigem Wachstum und sich hoch auftürmenden Stegen. Korrespondierend mit den Funktionen, als c-di-GMP-synthetisierende Diguanylatcyclasen oder c-di-GMP-abbauende Phosphodiesterasen, führten die Deletionen dieser kodierenden Gene zu veränderter Matrixproduktion. Nicht in jedem Fall basieren diese Unterschiede jedoch auf global veränderten c-di-GMP-Spiegeln. Für  $\Delta pdeH$  konnte jüngst eine globale Veränderung des zellulären c-di-GMP-Spiegels gezeigt werden, *dgcC* hingegen ist eher lokal für die Generierung des für die Cellulosesynthese notwendigen c-di-GMPs verantwortlich (Sarenko *et al.*, 2017) (Anja Richter und Regine Hengge, unpubliziert).

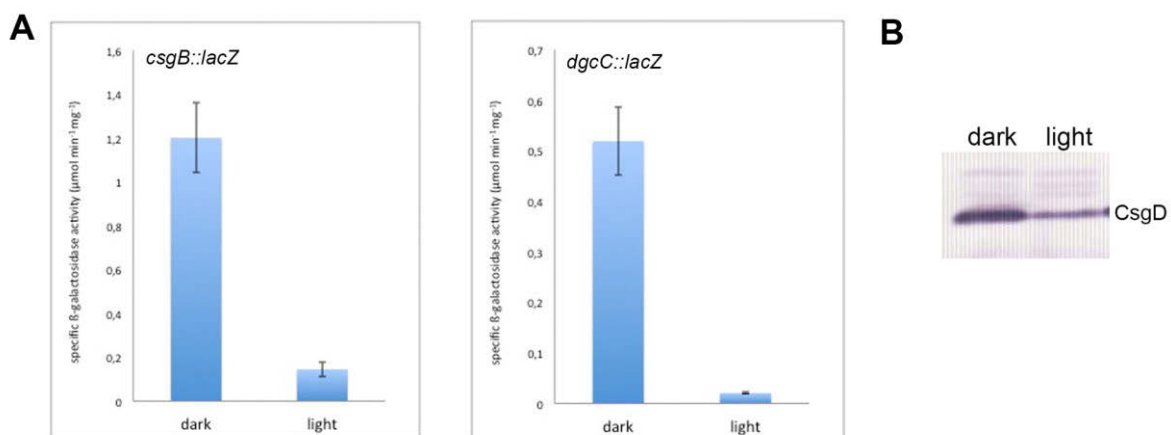
Für das bifunktionale Trigger-Enzym PdeR ist bereits bekannt, dass es in einem Komplex mit MlrA und DgcM c-di-GMP-abhängig den globalen Regulator der Matrixsynthese CsgD aktiviert. Bei hohen c-di-GMP-Konzentrationen baut PdeR verstärkt c-di-GMP ab und gibt MlrA und DgcM frei, womit diese die Transkription von CsgD stimulieren können (Hengge, 2016; Lindenberg *et al.*, 2013). In einer  $\Delta pdeR$ -Mutante wird also nicht nur weniger c-di-GMP abgebaut, der hauptsächliche und globale Effekt basiert auf der fehlenden Inhibition der CsgD-Expression bei niedrigen c-di-GMP-Spiegeln, wie sie in der exponentiellen Wachstumsphase auftreten. Dies führt zu verstärkter Matrixproduktion, was sich in den Makrokolonien durch einen weit ausgedehnten Biofilm mit hoher Steifigkeit zeigt. In der  $\Delta dgcM$ -Mutante fehlt hingegen die aktivierende Wirkung des MlrA/DgcM-Komplexes auf *csgD* und die damit verbundene Matrixproduktion. Die DGC-Aktivität wirkt sich nur gering auf den c-di-GMP-Spiegel der Zelle aus, folglich kommt es auch hier nahezu unabhängig der c-di-GMP-Spiegel zu veränderter Matrixsynthese (Sarenko *et al.*, 2017).

Eine phänotypisch sichtbare Veränderung der Matrixsynthese in Makrokolonie-Biofilmen kann demnach mehrere Ursachen haben und muss nicht immer auf global veränderte c-di-



GMP-Spiegel zurückzuführen sein. Die Kolonimorphologie der GGDEF-EAL-Mutanten unter Lichtausschluss sollte in dieser Arbeit nun mit Kolonien verglichen werden, welche unter konstanter Lichtbestrahlung wuchsen.

Es stellte sich zunächst heraus, dass der typische *rdar*-Morphotyp des im Dunkeln (dark) gewachsenen AR3110 Stammes unter Lichteinwirkung (light) völlig verloren ging (Abb. 27). Die Kolonie zeigte sich flach, klein und band nur noch wenig Kongorot. Augenscheinlich führte die Lichtbestrahlung zu einer stark erniedrigten Matrixsynthese. CsgD als globaler Aktivator der Matrixkomponenten könnte unter diesen Bedingungen nicht ausreichend vorliegen, was anhand eines Immunoblots mit CsgD-spezifischem Antikörper getestet werden sollte. Tatsächlich waren die CsgD-Proteinmengen in einer 24h unter ständiger Lichtbestrahlung gewachsenen Kolonie reproduzierbar geringer als bei der im Dunkeln inkubierten Kontrolle (Abb. 26 B). Ob sich dies auch direkt auf die Expression der CsgD-abhängigen, für Curli- und Cellulose-notwendigen Gene auswirkt, sollte durch *lacZ*-Reporterfusionen zu *csgB* und *dgcC* geklärt werden.

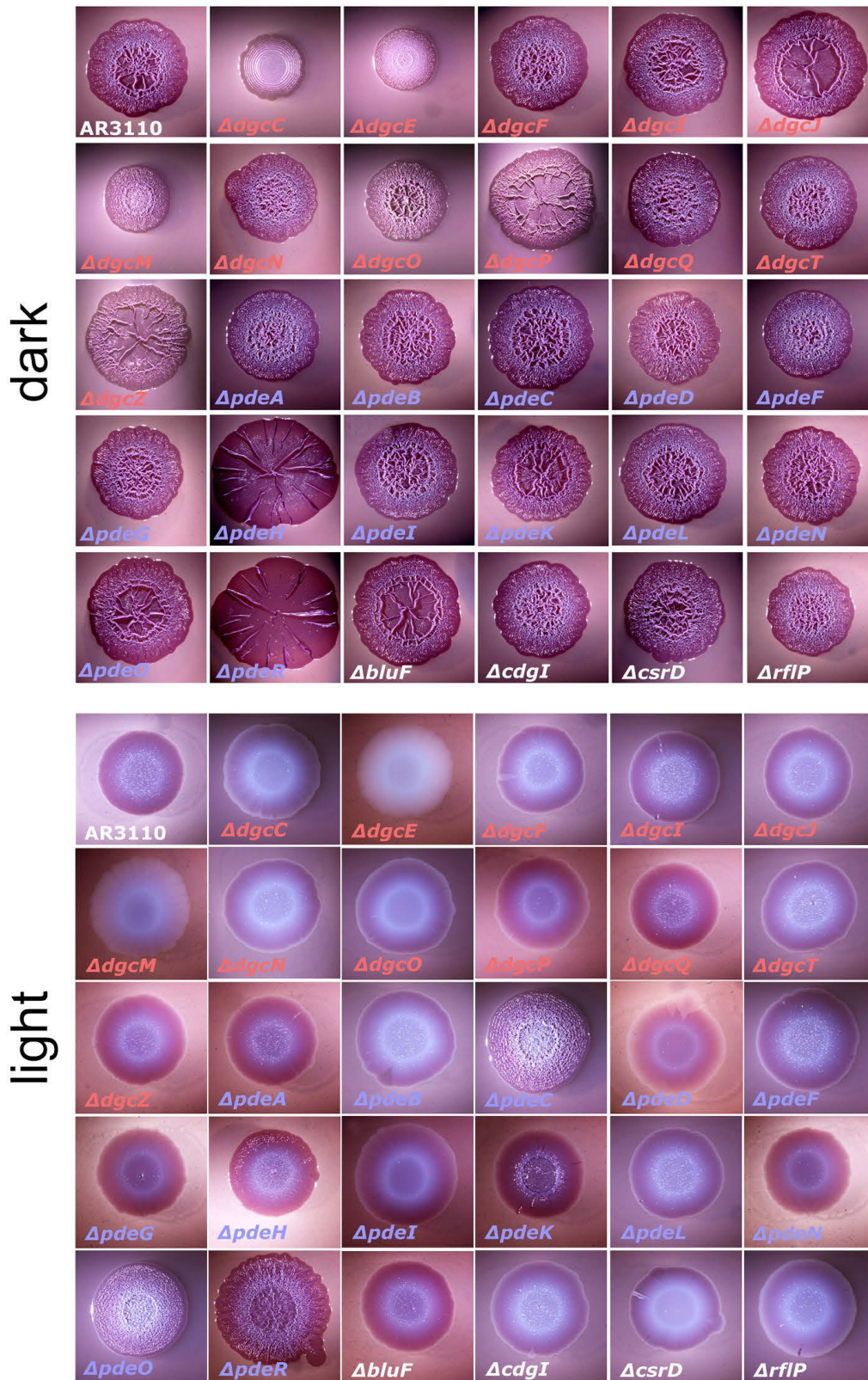


**Abb. 26: Licht reduziert die Expression Matrix-bildender Komponenten. A)** Expression der *csgB::lacZ*- und *dgcC::lacZ*-Reporterfusionen in Tropfkolonien die bei Dunkelheit (dark) oder unter Lichtbestrahlung (light) gewachsen sind. Die Probennahme erfolgte im W3110 nach 24h Wachstum bei 28°C auf einer LBnoS-Platte. **B)** Immunoblot zur Detektion der CsgD-Proteinspiegel von Tropfkolonien die in Dunkelheit (dark) oder unter Lichtbestrahlung (light) gewachsen sind. Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein, der Proteinnachweis erfolgte mit einem CsgD-spezifischen Antikörper. Die Probennahme erfolgte wie unter A).

Die Auswertung der Daten zeigte einen dramatischen Abfall der Expression beider Gene unter Lichteinwirkung, der demnach vornehmlich mit dem Verlust von CsgD unter diesen Bedingungen zu erklären ist (Abb. 26). Eine Ursache dieser drastisch reduzierten Matrixsynthese durch erniedrigte CsgD-Spiegel könnte sowohl verminderte c-di-GMP-Synthese als auch vermehrter Abbau des sekundären Botenstoffes in der Zelle sein. Um diesen Aspekt zu untersuchen wurden Mutanten aller GGDEF- und EAL-Protein-

kodierenden Gene unter Lichteinwirkung im Makrokolonie-Assay untersucht (Abb. 27). Es sollte ein Kandidat ausfindig gemacht werden, der zur Reduktion der Matrixsynthese beitrug und dessen Mutante daher zu einer vermehrten Strukturierung unter Lichteinfluss führen würde. Keine der unter Lichtbestrahlung gewachsenen Mutanten zeigte eine vollständige Rekonstitution des Wildtypphänotyps der in Dunkelheit herangezogenen Kolonien. Die Deletion von 4 Genen führte dennoch zu deutlichen Veränderungen der Koloniemorphologie. Während alle restlichen 25 GGDEF-EAL-Domänenproteine ein flaches Erscheinungsbild, so wie der unter Lichteinfluss-gewachsene Wildtyp zeigten, bildeten sich bei den Deletionen von *pdeC*, *pdeK* und *pdeO* kleine Fältchen und im Fall von *pdeR* sogar Wildtyp-ähnlich aufgetürmte Stege. Die Struktur aus kleinen viel verzweigten Fältchen, findet sich in ähnlicher Weise auch in der in Dunkelheit gewachsenen  $\Delta dgcM$ -Mutante.

Die Untersuchungen in diesem Abschnitt zeigen folglich, dass es unter Lichteinfluss CsgD-abhängig zu einer drastischen Reduktion der Matrixsynthese kommt, wodurch eine flache unstrukturierte Koloniemorphologie entsteht. Außerdem sind die 4 Phosphodiesterasen PdeC, PdeR, PdeK und PdeO an der Reduktion der Struktur beteiligt, da die Deletion ihrer Gene den durch Licht induzierten reduzierten Phänotypen teilweise aufhebt. Dies bedeutet zudem, dass diese Lichtreaktion auf die Matrixsynthese durch c-di-GMP gesteuert wird und sich oberhalb von PdeR bzw. an PdeR selbst abspielt, da PdeR den c-di-GMP-Sensor in der Kontrolle der CsgD Transkription darstellt.



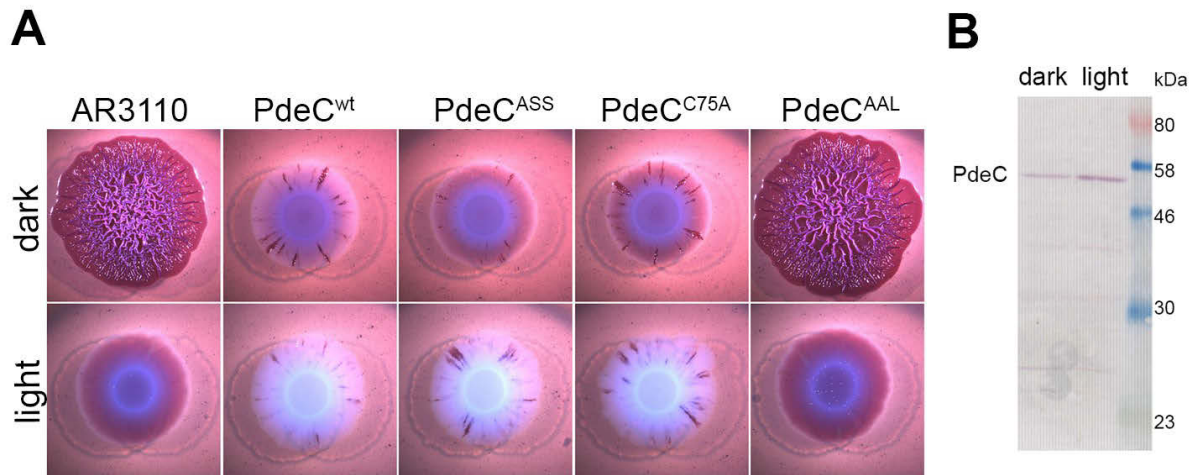
**Abb. 27: Lichtabhängige Reduktion der Matrixsynthese in Makrokolonien.** Auf Kongorot-haltigen LBnoS-Agarplatten wurden je 5 µl einer Übernachtskultur des *E. coli* K-12 AR3110 Stammes getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt (dark) oder unter Lichtbestrahlung (light) inkubiert. Untersucht wurden die Gendelektionsmutanten aller 29 GGDEF-EAL-Domänenproteine. Mutationen von DGCs sind rot beschriftet, PDEs blau und degenerierte Proteine sowie der Wildtyp weiß.

#### 4.5.1.2 Lichteinwirkung erhöht die Expression von PdeC

Die in dieser Arbeit untersuchte CSS-PDE PdeC zeigte als eine von 4 PDEs in *E. coli* K-12 einen Makrokolonie-Phänotypen unter Lichtbestrahlung. Setzt man Makrokolonien 5 Tage konstanter Lichtbestrahlung aus, sind diese kaum noch in der Lage extrazelluläre Matrixstrukturen auszubilden. Die Erscheinung dieser Kolonien ist daher hell und flach, ohne jegliche Aufwölbungen. Ist das für PdeC-kodierende Gen unter diesen Bedingungen deletiert, kommt es zu einer teilweisen Rekonstitution des Wildtyp-Phänotyps, was sich anhand vieler kleiner Fältchen und eines etwas größeren Durchmessers zeigt (Abb. 27).

Bezüglich dieses Ergebnisses wurde im folgenden Abschnitt die Rolle von PdeC bei Lichtstress genauer betrachtet. Vorangegangene Experimente dieser Arbeit haben gezeigt, dass die periplasmatischen Cysteine von PdeC durch das DsbA/B-System im oxidierten Zustand gehalten werden. Die Ausbildung einer Disulfidbrücke stabilisiert das ganze Protein und verhindert DegP/Q-vermittelten Abbau (Abschnitte 4.2.3 und 4.2.4). Die reduzierte Form von PdeC hingegen führt zu einer erhöhten PDE-Aktivität und wird im Verlauf des Wachstums abgebaut (Abschnitte 4.2.1, 4.3.1 und 4.4.1). Aufgrund der phänotypischen Veränderung der Makrokolonie einer  $\Delta pdeC$ -Mutante bei Lichtbestrahlung im Vergleich zum AR3110 Wildtypstamm sollte die Expression von PdeC unter diesen Bedingungen genauer betrachtet werden.

Der verstärkt strukturierte Phänotyp der  $\Delta pdeC$ -Makrokolonie bei Licht lässt die Vermutung zu, dass PdeC unter Lichtbestrahlung aktiv ist und zur Reduktion der Matrixstrukturen beiträgt. Unter diesen Umständen läge die CSS-Domäne im reduzierten, aktiven Zustand vor. Daher ist ein direkter Zusammenhang zwischen Photooxidation, welche durch Lichteinstrahlung ausgelöst werden kann und Redoxzustand nicht herstellbar. Auch die Makrokoloniemorphologie zeigt in Abhängigkeit vom Redoxzustand der plasmidkodierten PdeC-Derivate unter Lichteinfluss keine wahrnehmbaren Unterschiede (Abb. 28 A). Dies mag jedoch auch an der generell erniedrigten Matrixproduktion bei Licht liegen, die mit den PdeC-Plasmiden zu einem kompletten Verlust jeglicher Struktur und Kongorot-Bindung führt. Es konnte unter Lichteinfluss in chromosomal *pdeC::flag*-getaggtten W3110 Stämmen auch keine Abbaubande detektiert werden, wie sie bei Reduktion der CSS-Domäne entstehen würde (Abb. 28 B). Mit diesen Daten kann ein Redoxeffekt von Licht auf die CSS-Domäne von PdeC daher nicht bestätigt werden.



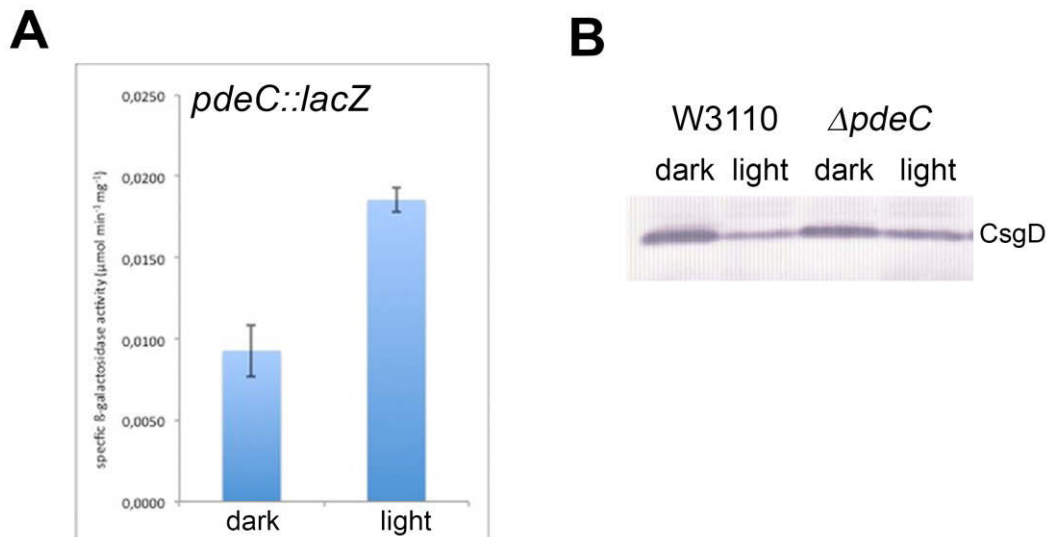
**Abb. 28: Einfluss von Licht auf die PdeC-Proteinexpression und die Makrokoloniemorphologie plasmidkodierter PdeC-Derivate.** **A)** Auf Kongorot- und Ampicillin-haltigen LBnoS-Agarplatten wurden je 5 µl einer Übernachtskultur des *E. coli* K-12 Stammes getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt (dark) oder unter Lichtbestrahlung (light) inkubiert. Untersucht wurde der Cellulose- und Curli-Fasern-produzierende Stamm AR3110, welcher die verschiedenen auf pCAB18 befindlichen PdeC-Derivate: PdeC<sup>wt</sup> (wildtypischer *pdeC* ORF), PdeC<sup>ASS</sup> (*pdeC* ORF mit C106A Mutation), PdeC<sup>C75A</sup> (*pdeC* ORF mit C75A Mutation) und PdeC<sup>AAL</sup> (*pdeC* ORF mit E303A Mutation) exprimiert. **B)** Immunoblot zur Detektion von chromosomal Flag-getaggttem PdeC-Protein in Tropfkolonien, die bei Dunkelheit (dark) oder unter Lichtbestrahlung (light) gewachsen sind. Die Probenahme erfolgte im W3110 nach 24h Wachstum bei 28°C auf einer LBnoS-Platte. Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 30 µg Gesamtprotein.

Dennoch ist ein indirekter Einfluss nicht auszuschließen. Wie sich in Abbildung 25 B außerdem zeigte, war die Proteinmenge von PdeC in Tropfkolonien unter Lichtbestrahlung etwas höher. Die Expression einer *pdeC::lacZ*-Reporterfusion zeigte zudem eine Regulation auf der Expressionsebene von PdeC (Abb. 29 A). In den hier untersuchten Tropfkolonien zeigte sich eine erhöhte Transkription der *pdeC::lacZ*-Fusion bei Lichtbestrahlung. Die spezifische Expression der Fusion stieg auf das Doppelte an, nachdem die Tropfkolonien 24h dem Licht ausgesetzt wurden. Somit sind die erhöhten Proteinmengen sehr wahrscheinlich Resultat einer verstärkten Genexpression von PdeC. Ob die erhöhte Matrixproduktion der Makrokolonie einer  $\Delta pdeC$ -Mutante unter Lichteinwirkung im Zusammenhang mit steigenden CsgD-Spiegeln steht, wurde ebenfalls untersucht und konnte bestätigt werden (Abb. 29 B).

Der Immunoblot mit CsgD-spezifischem Antikörper zeigte reproduzierbar erhöhte CsgD-Proteinmengen von Tropfkolonien unter Lichtbestrahlung verglichen mit völlig in Dunkelheit gewachsenen Kolonien. Dieser Effekt war schwächer in der  $\Delta pdeC$ -Mutante. Damit scheint die erhöhte Produktion von PdeC in der Zelle bei Lichtbestrahlung, zu erniedrigten CsgD-Spiegeln und damit verbunden zu einer geringeren Synthese von Matrixkomponenten zu führen.



Lichteinwirkung führt also zu verminderter Matrixproduktion, die zumindest teilweise durch erhöhte PdeC-Expression hervorgerufen wird. Ein direkter Einfluss auf den Redoxzustand der CSS-Domäne von PdeC konnte durch die hier gezeigten Daten nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 29: Licht erhöht die PdeC-Expression, was zu verminderten CsgD-Spiegeln führt. A)** Expression einer *pdeC::lacZ*-Reportergenfusion in Tropfkolonien, die bei Dunkelheit (dark) oder unter Lichtbestrahlung (light) gewachsen sind. Die Probennahme erfolgte im W3110 nach 24h Wachstum bei 28°C auf einer LBnoS-Platte. **B)** Immunoblot zur Detektion der CsgD-Proteinmengen von Tropfkolonien, die in Dunkelheit (dark) oder unter Lichtbestrahlung (light) gewachsen sind. Die Probennahme erfolgte wie unter A). Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein, der Proteinnachweis erfolgte mit einem CsgD-spezifischen Antikörper.

#### 4.5.2 Reaktion auf Eisenionen

Neben der Photooxidation trägt auch zweiwertiges Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in hohem Maße zu der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle bei. Dies geschieht durch die Katalyse der Fenton-Reaktion, bei der aus Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) das stark reaktive Hydroxyl-Radikal ( $\text{OH}$ ) entsteht. Eisen spielt aber auch eine wichtige Rolle als Kofaktor von sog. Metalloproteinen wie Hämoglobin, Cytochromen, Katalasen und Peroxidasen und ist damit am Sauerstofftransport sowie an Elektronenübertragungsreaktionen, beispielsweise in der Atmungskette, beteiligt. Daher ist ein ausgeglichener Eisenhaushalt zur Vermeidung von oxidativem Stress und zur Aufrechterhaltung wichtiger zellulärer Funktionen die an Eisen gekoppelt sind von großer Bedeutung (Touati, 2000b).

Zunächst sollte der generelle Effekt von zweiwertigem Eisen auf die Morphologie von Makrokolonien getestet werden. Vergleichend wurde auch Paraquat zur Erzeugung von

oxidativem Stress eingesetzt. Äquivalent zu den Lichtuntersuchungen wurde zudem die Transkription von *csgB* und *pdeC* mit Reporterengenfusionen ermittelt. Durch Immunoblots konnten auch potentielle Veränderungen der CsgD- und PdeC-Proteinmenge in der Zelle bei Eisen-induziertem Redoxstress detektiert werden. Die Zugabe der oxidativen Reagenzien  $\text{FeCl}_2$  (6 mM) und Paraquat (0,5 mM) erfolgte in 100  $\mu\text{l}$  einer *E. coli* Übernacht-Kultur. Nach dem Vortexen wurden direkt 5  $\mu\text{l}$  der behandelten Kultur bzw. der Kontrolle auf Yesca-Platten getropft. Für den Makrokolonie-Assay erfolgte eine 5-tägige Inkubation von AR3110-Derivaten im Dunkeln bei 28°C auf Kongorot-haltigem Medium. Die Probenentnahme für den Immunoblot-Assay und die Messung der Reporterengenfusion erfolgte ebenfalls aus Makrokolonien. Diese wurden jedoch lediglich 24h auf Kongorot-freien LBnoS-Platten inkubiert. Die entstandene Kolonie wurde anschließend von der Platte gekratzt und sorgfältig resuspendiert. Hier wurde der Cellulose-negative W3110 Stamm verwendet, der bessere Resultate bei der Resuspendierung der Zellen zeigte (siehe Abschnitt 4.5.1). Auch der Einfluss von Eisen auf die plasmidkodierten PdeC-Derivate wurde anhand der Makrokoloniemorphologie betrachtet.

#### 4.5.2.1 Eisen führt zu verstärkter Produktion von Cellulose

Das initiale Experiment, bei dem man Übernachtskulturen zunächst mit Eisen ( $\text{FeCl}_2$ ) oder Paraquat behandelte, bevor sie auf eine Kongorot-haltige Yesca-Platte getropft wurden, zeigte bereits interessante Resultate (Abb. 30 A). Bei dem Vergleich des Wildtyp-Stammes mit der durch  $\text{FeCl}_2$  gestressten Kolonie wurde eine deutliche Zunahme der Struktur sichtbar. Während auf Yesca wachsende Makrokolonie-Biofilme des *E. coli* AR3110-Stammes nur sehr geringfügig bis gar nicht strukturiert waren, zeigte sich nach der Behandlung mit Eisen eine komplexe Anordnung vieler Falten sowie ein größerer Durchmesser der Kolonie. Für Paraquat konnte dies nicht beobachtet werden, hier kam es nur peripher zu kleineren Fältchen. Der Cellulose-negative Stamm W3110 zeigte keine solchen Veränderungen, hier behielt die mit Eisen behandelte Kolonie den flachen wildtypischen Phänotyp.

Um zu verifizieren, dass die Abwesenheit von Cellulose im W3110 zum Verlust der Reaktion auf Eisen führte, wurde die  $\Delta\text{dgcC}$ -Mutante im Curli- und Cellulose-positiven Stamm AR3110 ebenfalls untersucht. Die Deletion des Gens, welches für die Cellulose-spezifische DGC DgcC kodiert, kreiert einen AR3110-Stamm ohne die Fähigkeit der Celluloseproduktion (siehe Abb. 27 oben). Das Resultat ergab, dass es auch in diesem Stammhintergrund zu keiner Eisen-induzierten verstärkten Strukturierung der Makrokolonie kam. Hinzu kommt, dass die Expression der *csgB::lacZ*-Reporterengenfusion keine Veränderung zeigte, ob mit Eisen, Paraquat oder völlig unbehandelt (Abb. 30 C). Daher scheint Eisen spezifisch zu

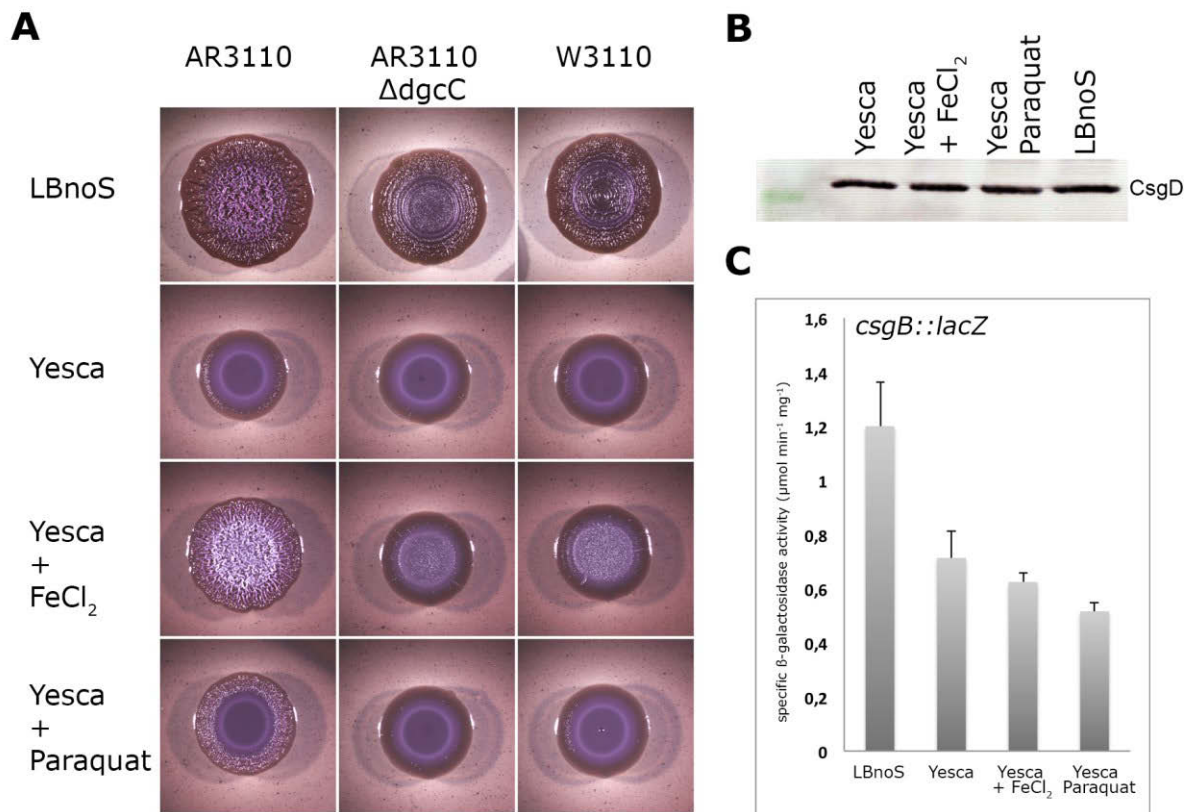
einer erhöhten Celluloseproduktion zu führen, aber keinen Einfluss auf die Expression von Curli-Fasern zu haben.

Auf LBnoS-Platten ist eine Makrokolonie des *E. coli* K12 Stammes deutlich stärker strukturiert und deutet daher im Vergleich mit Yesca-Medium auf eine höhere Matrixproduktion hin. Die Expression der *csgB::lacZ*-Fusion von Kolonien, welche auf Yesca-Medium angezogen wurden, zeigte verglichen mit LBnoS in diesem Zusammenhang einen Abfall von nahezu 50% der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Die Expression der Curli-Fasern trägt demnach zur reduzierten Koloniemorphologie auf Yesca-Platten bei.

Die Transkription des Curli-Struktur-Operons *csgBAC*, wie auch der Cellulose-spezifischen DGC *dgcC* wird durch CsgD aktiviert (Hammar *et al.*, 1995; Brombacher *et al.*, 2003). Ein Immunoblot mit CsgD-spezifischem Antikörper zeigte jedoch keine Veränderungen der CsgD-Proteinmenge in Kolonien, die auf LBnoS oder Yesca gewachsen waren bzw. mit Eisen oder Paraquat behandelt wurden (Abb. 30 B). Die Veränderung der Celluloseproduktion durch Eisen und die verminderte Curli-Expression auf Yesca kann demnach nicht auf veränderte CsgD-Spiegel in der Zelle zurückgeführt werden.

Die hier gesammelten Daten zeigen, dass auf Yesca-gewachsene Kolonien weniger Curli-Fasern exprimieren, dies könnte zur flachen Koloniemorphologie auf diesem Medium beitragen. Zudem wurde eine Induktion der Celluloseproduktion auf Yesca-Platten durch reduziertes Eisen nachgewiesen.





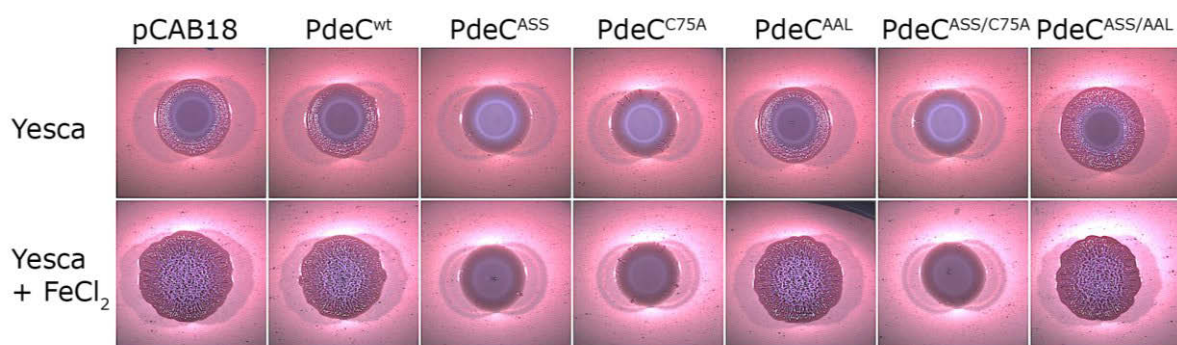
**Abb. 30: Der Einfluss von Eisen auf die Curli- und Cellulosesynthese. A)** Auf Kongorot-haltigen LBnoS- und Yesca-Platten wurden je 5  $\mu\text{l}$  einer Übernachtskultur der *E. coli* K-12 Stämme AR3110, W3110 und einer  $\Delta dgcC$ -Mutante im AR3110 Hintergrund getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt inkubiert. Die Behandlung mit  $FeCl_2$  (6 mM) und Paraquat (0,5 mM) erfolgte direkt in 100  $\mu\text{l}$  der Übernachtskultur, welche dann gevortext und anschließend auf Yesca-Platten getropft wurden. **B)** Immunoblot zur Detektion der CsgD-Proteinmengen in Tropfkolonien, welche auf Yesca oder LBnoS gewachsen sind. Die Probennahme erfolgte im W3110 nach 24h Wachstum bei 28°C auf einer LBnoS-Platte. Die Behandlung mit Eisen und Paraquat erfolgte wie unter A). Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein, der Proteinnachweis wurde mit einem CsgD-spezifischen Antikörper durchgeführt. **C)** Expression der *csgB::lacZ*-Reportergenfusion in Tropfkolonien die 24h auf Yesca oder LBnoS gewachsen sind. Probennahme und Behandlung mit Eisen und Paraquat erfolgte wie unter B).

#### 4.5.2.2 PdeC<sup>ASS</sup> eliminiert die verstärkte Produktion von Cellulose durch Eisen

Zweiwertiges Eisen vermag die Induktion der Cellulosesynthese in Makrokolonie-Biofilmen auf Yesca-Medium, unabhängig von den CsgD-Proteinmengen (Abb. 30). Die Synthese von Cellulose ist abhängig von hohen Konzentrationen des sekundären Botenstoffes c-di-GMP. Die Menge an c-di-GMP wird über Phosphodiesterasen und Diguanylatcyclasen reguliert, welche durch ihre verschiedenen N-terminalen sensorischen Domänen unter den verschiedensten Bedingungen aktiviert oder inaktiviert werden können und sich folglich auf den Abbau und die Synthese des sekundären Botenstoffes auswirken (siehe Abschnitte 1.3.2 und 1.3.3.). Für die CSS-PDE PdeC konnte im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden,

dass die konservierten Cysteine in der periplasmatischen Sensordomäne durch das DsbA/DsbB-System vorwiegend oxidiert sind, d.h. eine DSB ausgebildet ist (siehe Abschnitte 4.2.3 und 4.4.1). Demnach scheint PdeC durch Eisenstress nicht aktiviert werden zu können, vielmehr verbleibt es in seinem inaktiven Zustand. Nichtsdestotrotz kann unter diesen Bedingungen ein Einfluss der konstant reduzierten PdeC-Varianten auf die erhöhte Celluloseproduktion untersucht werden.

Hierzu wurden verschiedene plasmidkodierte PdeC-Derivate bezüglich ihrer Koloniemorphologie auf Yesca-Platten mit und ohne Zugabe von 6 mM  $\text{FeCl}_2$  getestet (Abb. 31). Dabei wurden die PdeC-Derivate eingesetzt, die durch die Mutation eines oder beider konservierter Cysteine nicht mehr zur Bildung einer Disulfidbrücke im Periplasma befähigt waren ( $\text{PdeC}^{\text{ASS}}$ ,  $\text{PdeC}^{\text{C75A}}$ ,  $\text{PdeC}^{\text{ASS/C75A}}$ ), sowie eine enzymatisch inaktive Variante im Wildtyp ( $\text{PdeC}^{\text{AAL}}$ ) und in einer DSB-defizienten Mutante ( $\text{PdeC}^{\text{ASS/AAL}}$ ) und das Plasmid mit dem wildtypischen ORF von *pdeC*. Die Auswertung der Daten mit dem Leerplasmid pCAB18 zeigte dieselbe Eisen-induzierte Aktivierung der Cellulosesynthese wie sie schon im vorherigen Abschnitt beobachtet werden konnte. Die starke Veränderung der Koloniemorphologie bei Eisenbehandlung, von einem nahezu flachen Erscheinungsbild zu vielen kleinen aufgetürmten Fältchen, zeigte sich auch bei der Expression des  $\text{PdeC}^{\text{wt}}$ -Plasmids in der Makrokolonie. Hingegen blieben DSB-defiziente PdeC-Varianten völlig flach und führten zu keiner Induktion der Celluloseproduktion nach Eisenbehandlung. Die wildtypische Reaktion auf  $\text{FeCl}_2$  konnte in den Cystein-Mutanten durch die Eliminierung der PDE-Aktivität in der  $\text{PdeC}^{\text{ASS/AAL}}$ -Variante wiederhergestellt werden.



**Abb. 31: DSB-defiziente PdeC-Derivate verhindern die erhöhte Cellulosesynthese durch Eisen.** Auf Kongorot- und Ampicillin-haltigen Yesca-Platten wurden je 5  $\mu\text{l}$  einer Übernachtskultur des *E. coli* K-12 Stammes getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt inkubiert. Die Behandlung mit  $\text{FeCl}_2$  (6 mM) erfolgte direkt in 100  $\mu\text{l}$  der Übernachtskultur, welche dann gevortext und anschließend auf die Platte getropft wurde. Untersucht wurde der Cellulose- und Curli-Fasern-produzierende Stamm AR3110, welcher die verschiedenen auf pCAB18 befindlichen PdeC-Derivate:  $\text{PdeC}^{\text{wt}}$  (wildtypischer *pdeC* ORF),  $\text{PdeC}^{\text{ASS}}$  (*pdeC* ORF mit C106A Mutation),  $\text{PdeC}^{\text{C75A}}$  (*pdeC* ORF mit C75A Mutation),  $\text{PdeC}^{\text{AAL}}$  (*pdeC* ORF mit E303A Mutation) sowie Kombination aus C106A und C75A ( $\text{PdeC}^{\text{ASS/C75A}}$ ) und C106A und E303A ( $\text{PdeC}^{\text{ASS/AAL}}$ ) exprimierte.

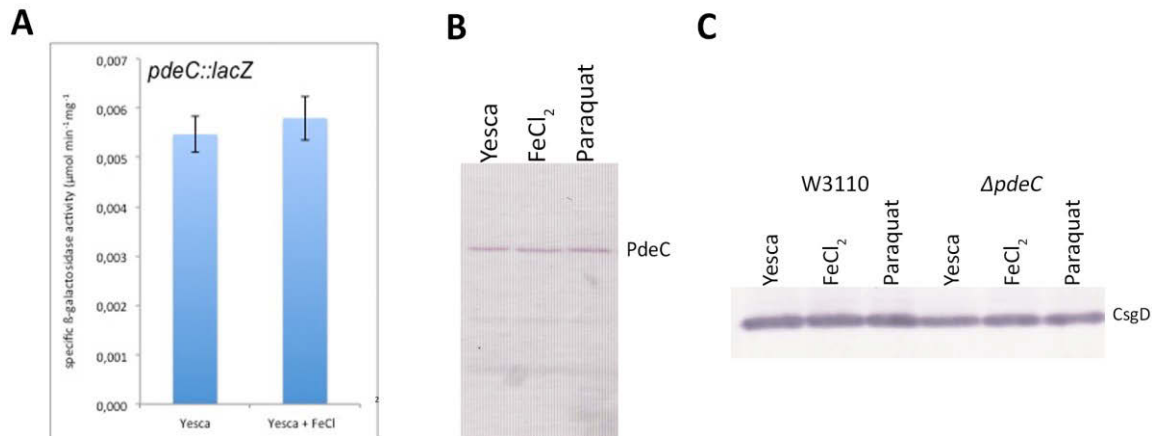
PdeC-Derivate, welche unfähig zur Bildung einer intramolekularen DSB innerhalb der konservierten Cysteine in der periplasmatischen CSS-Domäne sind, können folglich die Eisen-induzierte Celluloseproduktion unterbinden. Dies geschieht in Abhängigkeit der PDE-Aktivität von PdeC und bestätigt erneut die erhöhte enzymatische Aktivität der EAL-Domäne bei reduzierter CSS-Domäne, d.h. wenn die konservierten Cysteine keine intramolekulare DSB bilden können.

#### 4.5.2.3 Eisenzugabe verändert nicht die Expression von PdeC

Für die Behandlung mit Licht konnte eine Steigerung der PdeC-Expression auf Protein- und Transkriptionsebene festgestellt werden. Nach einer 24h langen Bestrahlung von Makrokolonien mit einer Tageslichtlampe, zeigte das chromosomal Flag-getaggte PdeC-Protein, verglichen zu der in Dunkelheit gewachsenen Kolonie erhöhte Proteinmengen. Die *pdeC::lacZ*-Reporterfusion wies zudem auf eine stark erhöhte Transkription von *pdeC* unter diesen Bedingungen hin. Aufgrund erhöhter CsgD-Proteinmengen und verstärkter Strukturierung von mit Licht behandelten Makrokolonien in einem *pdeC*-negativem Stammhintergrund spielt PdeC als PDE bei der Reduktion der Matrixsynthese unter Lichtbestrahlung nachweislich eine Rolle. In diesem Kontext ist wahrscheinlich die erhöhte Expression von PdeC für diesen Effekt verantwortlich.

Ob es auch bei Eisen- und Paraquat-induziertem Redoxstress zu Veränderungen der Expression von PdeC kommt, wurde auf Proteinebene mit N-terminal Flag-getaggttem PdeC im Immunoblot getestet und auf Transkriptionsebene durch eine *pdeC::lacZ*-Reporterfusion untersucht. Ebenso wurden in Makrokolonien einer  $\Delta pdeC$ -Mutante und des W3110-Wildtyps, welche wie in Abschnitt 4.5.2. beschrieben mit  $FeCl_2$  und Paraquat behandelt wurden, die CsgD-Proteinmengen durch Immunoblot bestimmt. Weder die *pdeC::lacZ*-Fusion noch der Immunoblot mit chromosomal Flag-getaggttem PdeC zeigten Veränderungen der Expression bei den hier untersuchten Bedingungen (Abb. 32). Demnach führen weder Eisen noch Paraquat zu erhöhten oder erniedrigten PdeC-Proteinmengen, bzw. im Fall von Eisen blieb auch die Transkription von *pdeC::lacZ* unverändert (Abb. 32 A und B). Bekannt ist, dass Eisen und Paraquat in 24h alten Makrokolonien zu keiner Veränderten CsgD-Expression führen (siehe Abschnitt 4.5.2.1). Anhand der in Abbildung 32 C gezeigten Experimente, sollten daher die CsgD-Proteinspiegel in *pdeC*-negativem Hintergrund bei oxidativem Stress durch Eisen und Paraquat untersucht werden. Auch unter diesen Bedingungen zeigte sich keine Veränderung bei der Expression des CsgD-Proteins. Zusammenfassend ist durch die hier dargelegten Daten kein Einfluss von Eisen oder Paraquat auf die Expression von PdeC nachweisbar.

Reduziertes Eisen als Katalysator der Fenton-Reaktion, bei der reaktive Sauerstoffspezies entstehen, führt zu verstärkter Produktion von Cellulose in Makrokolonien. Die konstant reduzierten PdeC-Plasmidvarianten können diesen Celluloseanstieg durch erhöhte PDE-Aktivität unterbinden. Die Expression von PdeC wird durch Eisen nicht verändert.



**Abb. 32: Eisen hat keinen Einfluss auf die Expression von PdeC und CsgD.** **A)** Expression einer *pdeC::lacZ*-Reporterfusion in Tropfkolonien auf Yesca-Platten. Die Probennahme erfolgte im W3110 nach 24h Wachstum bei 28°C. Die Behandlung mit FeCl<sub>2</sub> (6 mM) erfolgte direkt in 100  $\mu\text{l}$  der Übernachtskultur, welche dann gevortext und anschließend auf die Platte getropft wurde. **B)** Immunoblot zur Detektion von chromosomal Flag-getagtem PdeC-Protein in Tropfkolonien von Yesca-Platten. Die Probennahme und Behandlung erfolgte wie unter A), für Paraquat (0,5 mM) wurde genauso vorgegangen wie für FeCl<sub>2</sub>. Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 30  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein. **C)** Immunoblot zur Detektion der CsgD-Proteinmengen von Tropfkolonien auf Yesca-Platten. Die Probennahme erfolgte wie unter B). Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein, der Proteinnachweis erfolgte mit einem CsgD-spezifischen Antikörper.

## 5 Diskussion

### 5.1 Redox-abhängige Aktivierung von PdeC und die Rolle von DsbA/B

PdeC ist neben PdeN, PdeG, PdeB und PdeD eine von fünf CSS-Phosphodiesterasen (CSS-PDEs) in *E. coli* K-12. Diese Proteine definieren sich über eine sehr charakteristische Domänenstruktur mit einer großen periplasmatischen Schleife, die von je einer Transmembrandomäne flankiert wird und an eine C-terminal im Cytoplasma befindliche EAL-Domäne gekoppelt ist (Abb. 6). Der im Periplasma befindliche Bereich umschließt rund 200 AS und nur drei davon sind tatsächlich in allen CSS-PDEs aus *E. coli* K12 konserviert. Darunter befinden sich zwei Cysteine und ein Serin. Das erste Cystein liegt N-terminal direkt am Anfang des periplasmatischen Bereichs während das zweite Cystein 29-30 AS weiter innerhalb des CSS-Motivs lokalisiert ist. Aufgrund dieser stark konservierten Aminosäuren, in der sonst sehr variablen periplasmatischen Domäne, etablierte sich die Bezeichnung der CSS-PDEs (Spurbeck *et al.*, 2012; Hengge *et al.*, 2015b).

Phosphodiesterasen sind an der Degradierung von c-di-GMP beteiligt und besitzen häufig N-terminal lokalisierte Sensordomänen, welche ihre Aktivität steuern. So stellt auch die CSS-Domäne eine potentielle Sensordomäne zur Regulierung der enzymatischen Aktivität der EAL-Domäne in CSS-PDEs dar. In dieser Arbeit wurde PdeC, als Prototyp dieses Typs von Sensor-gekoppelten EAL-Domänenproteinen, zur Aufklärung von Funktion und Wirkungsweise der CSS-PDEs herangezogen. Im Fokus der Untersuchung standen die konservierten Cysteine an Position 75 und 106 (CSS).

Cysteine nehmen eine besondere Rolle unter den Aminosäuren ein, denn neben Methionin sind sie primär das Ziel von redox-abhängigen Modifikationen. Besonders die Oxidation der unter reduzierenden Bedingungen frei vorliegenden Thiolgruppen zu einer Disulfidbrücke (DSB) ist bei der Faltung und Funktion von Proteinen von großer Bedeutung (Berkmen, 2012; Hillion & Antelmann, 2015).

Gram-negative Bakterien besitzen, im Gegensatz zu ihren gram-positiven Verwandten, eine innere und eine äußere Membran die das Periplasma umschließt. Abgetrennt vom Cytoplasma hat sich hier ein eigenes Kompartiment mit spezifischen Eigenschaften gebildet. Während im Cytoplasma, im Hinblick auf den Redoxstatus, das Thioredoxin- und Glutharedoxin-System für eine eher reduzierende Umgebung sorgen, dominiert im Periplasma das oxidierende System bestehend aus DsbA und DsbB (Inaba, 2009; Meyer *et al.*, 2009). Das führt dazu, dass benachbarte Cysteinreste im Cytoplasma zumeist reduziert vorliegen und im Periplasma zu einer Disulfidbrücke oxidiert sind. Besonders die Protein-Disulfid-Isomerase DsbA bildet sehr effektiv Disulfidbrücken zwischen benachbarten Cysteinen anderer Proteine aus, indem sie diese oxidiert (Quan *et al.*, 2007; Wunderlich &

Glockshuber, 1993). Da DsbA durch sein hohes Redoxpotential dazu neigt auch fehlerhafte DSB zwischen in der Primärsequenz benachbarten Cysteinen einzufügen, bedarf es eines antagonistischen reduzierenden Systems. Dieses stellt DsbD/DsbC/DsbG dar und gibt damit fehlgefalteten Proteinen erneut die Möglichkeit den Zyklus der Oxidation durch DsbA/DsbB zu durchlaufen. Außerdem bildet es die Grundlage zur Erhaltung der Redoxhomöostase unter oxidativen Stressbedingungen (Cho and Collet, 2013).

Mit der Herstellung spezifischer Cystein- und EAL-Mutanten von PdeC gelang ein interessanter Einblick in den Redoxmechanismus von membranständigen Proteinen im Periplasma. Zunächst zeigte sich, dass PdeC bereits durch geringe Überexpression von einem Niedrigkopien-Vektor einen drastischen Einfluss auf die Morphologie einer Makrokolonie hat (Abb. 10). Bereits die Verwendung des PdeC<sup>wt</sup>-Plasmids führte dabei zu einem starken Verlust oberflächlicher Strukturierung. PdeC-Derivate, welche unfähig zur Bildung einer DSB waren hatten zudem einen verstärkten Effekt, der sich durch vollständigen Strukturverlust und verminderte Rotfärbung, also weniger Kongorot-Bindung zeigte. Makrokolonie-Biofilme zeigen spezifische Phänotypen bei dem Vorhandensein oder der Abwesenheit bestimmter Matrixkomponenten (Abb. 7). Der hier verwendete AR3110 Wildtyp-Stamm produziert sowohl Curli-Fasern als auch Cellulose, was zu einer komplexen dreidimensionalen Struktur aus Falten und hohen Stegen, sowie einer starken Kongorot-Bindung führt. Ausschließlich Curli oder Cellulose-produzierende Kolonien zeigen andererseits ringartige Strukturen bzw. viele kleine Fältchen. Stämme, denen beide Matrixkomponenten fehlen, sind flach und binden kein oder nur noch sehr geringe Mengen Kongorot (Romling, 2005; Serra *et al.*, 2013a). Letztere phänotypische Attribute treffen auch auf Kolonien zu, welche die oben genannten PdeC-Derivate exprimieren. Daraus lässt sich folgern, dass PdeC und insbesondere die DSB-defizienten Varianten zu einer Reduktion der Matrixproduktion in Makrokolonie-Biofilmen führen.

Abbau und Synthese von c-di-GMP spielen eine zentrale Rolle bei der Matrixsynthese. Daher könnte der Effekt der PdeC-exprimierenden Plasmide in Makrokolonien auf die Enzymaktivität der CSS-PDE zurückgeführt werden. Bestätigt wurde dies durch die Mutation des für die enzymatische Funktion von PDEs essentiellen EAL-Motivs in ein AAL-Motiv, was zu einer völligen Regeneration des Phänotyps in Makrokolonien führte. Auch die DSB-defiziente PdeC<sup>ASS</sup>-Variante wies mit zusätzlicher AAL-Mutation keinerlei Unterschied mehr zu einer wildtypischen AR3110 Makrokolonie auf.

Die Untersuchung der PdeC-Konstrukte auf Proteinebene mittels Immunoblot zeigte, dass der Austausch der konservierten Cysteine in PdeC elementare Folgen hat (Abb. 11 A). Durch den Verlust eines der Cysteine kann in der periplasmatischen CSS-Domäne keine intramolekulare DSB mehr ausgebildet werden, was zwei Konsequenzen hat. Zum einen erfolgt der Abbau zu einem Fragment, welches aus der 2. Transmembrandomäne und der

EAL-Domäne besteht, zum anderen kommt es zu einer Dimerisierung durch die Einführung einer intermolekularen DSB (Abb. 11 A und Abb. 13). Die Dimerisierung durch eine intermolekulare DSB wurde in der Doppel-Cystein-Mutante PdeC<sup>ASS/C75A</sup> nicht beobachtet. Da das Vorhandensein nur eines Cysteins artifiziell ist und so in der Zelle nicht vorkommen würde, kann davon ausgegangen werden, dass diese Art der Dimerisierung für die Funktion von PdeC nicht von Bedeutung ist. Vielmehr werden durch die moderate Überproduktion von PdeC auf dem Plasmid die Kapazitäten der für den Abbau verantwortlichen Proteasen überschritten sein und zurückbleibendes Protein in der oxidierenden Umgebung des Periplasmas zur Bildung von Homodimeren gezwungen werden. Zusätzlich bestätigte die Behandlung mit dem Reduktionsreagenz DTT, dass die periplasmatischen Cysteine von wildtypischem PdeC unter Standardbedingungen oxidiert sein müssen, denn sobald es zur Reduktion kommt, wurde auch eine Degradierung induziert (Abb. 11 B).

Das DSB-System des Periplasmas ist an vielen redox-abhängigen Prozessen beteiligt, so konnte auch eine Verbindung mit der CSS-PDE PdeC hergestellt werden (Cho & Collet, 2013; Ren *et al.*, 2014). Unter wildtypischen Bedingungen wird durch das oxidierende DsbA/DsbB System eine intramolekulare DSB zwischen C75 und C106 generiert (Abb. 12). Die Konsequenz daraus ist voraussichtlich eine kompaktere Faltung des Proteins, welche vor Angriffen der Proteasen DegP und DegQ schützt, die vornehmlich große ungefaltete Bereiche erkennen und degradieren (Clausen *et al.*, 2011). Das reduzierende DSB-System, bestehend aus DsbC/D/G, führt in der stationären Wachstumsphase zu verminderten PdeC-Proteinmengen. Im Gegensatz zu DsbA/B werden Disulfidbrücken hier aufgebrochen (Abb. 12 rechts). Das heißt, unter diesen Bedingungen liegt die CSS-Domäne vermehrt reduziert vor und PdeC wird der Proteolyse zugeführt. Das DSB-System ist demnach maßgeblich am Redoxstatus der CSS-Domäne von PdeC beteiligt und somit auch an dessen Aktivität (siehe Abschnitt 5.2).

Es ist durchaus denkbar, dass unter anaeroben Bedingungen das DsbA/DsbB-System, durch den fehlenden finalen Akzeptor Sauerstoff, nicht ausreichend Elektronen über die Atmungskette ableiten kann und dadurch einen Teil seiner oxidativen Kapazität verliert. Alternative Elektronenakzeptoren wie Fumarat oder Nitrat, welche unter Sauerstoffmangel genutzt werden, sind bei weitem nicht so effektiv wie O<sub>2</sub> und tragen daher womöglich zu dem verringerten Elektronabfluss bei (Unden and Bongaerts, 1997). Unter diesen Umständen, d.h. wenn *E. coli* Bakterien von der Umwelt in einen Wirtsorganismus gelangen, könnte demnach die verringerte Kapazität des DsbA/B-Systems zu verstärkter Reduktion der CSS-Domäne führen und eine verminderte Matrixsynthese auslösen. Auch in einer Makrokolonie befindet sich die untere, direkt auf dem Agar liegende Zone der Zellen in einem anaeroben Bereich. Durch die 3-dimensionale Struktur einer solchen Kolonie mit einer Schichtdicke von bis zu 0,2 mm bildet sich ein Sauerstoffgradient aus, der den unteren

Bereich der Kolonie zu einer anaeroben Umgebung macht (Serra et al., 2013a). Dieser anaerobe Bereich kann also zu einer Aktivierung von PdeC durch die Reduktion der konservierten Cysteine führen.

Unter aeroben wildtypischen Bedingungen wird PdeC jedoch RpoS-abhängig, also in der oberen Schicht der Kolonie exprimiert. Hier ist die CSS-Domäne folglich oxidiert und PdeC trägt nicht zu einer Reduktion der Matrixproduktion bei. Der *tac*-Promotor von pCAB18 induziert die Expression von PdeC jedoch auch in der postexponentiellen Wachstumsphase, also in der unteren Schicht der Makrokolonie. Diese Tatsache und die leichte Überproduktion des Proteins vom Plasmid erklärt vermutlich die Reduktion der Matrixsynthese mit dem PdeC<sup>wt</sup>-Plasmid auf LBnoS wachsenden Kolonien. Auf Yesca wachsende Kolonien zeigen keinen Effekt mit diesem Plasmid, was an der generell geringeren Matrixproduktion liegen könnte. Die PdeC<sup>ASS</sup>-Variante hingegen führt auch unter diesen Bedingungen zu einer Erniedrigung der Koloniestruktur und zeigt damit eine erhöhte PDE-Aktivität durch die konstant reduzierte CSS-Domäne.

Neben der indirekten Regulation über die Sauerstoffverfügbarkeit könnten auch direkte Inhibitoren des DsbA/DsbB-Systems zu vermehrt reduziertem PdeC führen. Solche Inhibitoren könnten direkt mit Quinone und/oder DsbA um die Bindung an DsbB kompetieren und somit den Elektronenfluss unterbrechen, was schwerwiegende Folgen für die Funktion vieler noch ungefalteter, sekretierter Proteine hätte (Früh et al., 2010; Landeta et al., 2015; Landeta et al., 2017). DsbB ist einzigartig in Prokaryoten, so ist es durchaus denkbar, dass höhere Organismen DsbB-Inhibitoren selbst produzieren und diese nutzen, um bakteriellem Wachstum und speziell Biofilmbildung entgegen zu wirken.

Die Regulation vieler Transkriptionsfaktoren erfolgt über einen Thiol-Disulfid-Schalter (siehe Abschnitt 1.4.3.). Diese können cytoplasmatisch, aber auch membranintegriert bei Redoxveränderungen die Expression von Genen regulieren. Für Enzyme wie PdeC, welche Abbau und Synthese von sekundären Botenstoffen kontrollieren, konnte ein solcher Mechanismus noch nicht nachgewiesen werden. CadC in *E. coli* und TcpP und ToxR aus *Vibrio cholerae* sind prominente Beispiele für membranständige Transkriptionsfaktoren, die über einen Thiol-Disulfid-Switch reguliert werden (siehe Abschnitt 1.4.3.). Diese Faktoren sind strukturell mit den CSS-PDEs jedoch nicht vergleichbar. So ist allein die Orientierung in der Membran gegensätzlich, denn die regulatorische, DNA-bindende HTH-Domäne befindet sich N-terminal, während die periplasmatische DSB-bildende Domäne am C-terminus lokalisiert ist (Eichinger et al., 2011; Krukonis et al., 2000). ToxR und ToxP aus *V. cholerae* führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors ToxT, der neben diversen Virulenzgenen die Expression des Cholera-toxins und des Toxin-koregulierten Pilus aktiviert. Die Aktivität beider Faktoren erfolgt über periplasmatische Koaktivatoren, die bei ToxR eine Dimerisierung induzieren und bei TcpP vor Degradierung schützen (Morgan et al., 2015;



Krukonis *et al.*, 2000). Die Dimerisierung im Fall von TcpP erfolgt über die Ausbildung einer kovalenten DSB, was prinzipiell auch bei PdeC möglich wäre, jedoch nur in den Mono-Cystein-Varianten (PdeC<sup>ASS</sup> und PdeC<sup>C75A</sup>) beobachtet werden konnte (Yang *et al.*, 2013). Daher ist für PdeC die Bildung einer intramolekularen DSB effizienter und physiologisch von höherer Relevanz.

Analog zu PdeC unterliegen auch ToxR und TcpP einer eng kontrollierten sequentiellen Proteolyse, wenn sich ihre regulatorischen Cysteine in der freien Thiol-Form befinden. Unter spezifischen Umweltbedingungen erfolgt eine Degradierung über zwei Schritte, die auch als regulierte Intramembran-Proteolyse (RIP) bekannt ist und zu einem Verlust der Aktivität führt (Almagro-Moreno *et al.*, 2015; Teoh *et al.*, 2015). Folglich schützt auch bei TcpP und ToxR die Bildung einer DSB vor dem Abbau. Zusätzlich sind hier jedoch die akzessorischen, periplasmatischen Proteine ToxS und TcpH an der Stabilisierung beteiligt (Almagro-Moreno *et al.*, 2015; Morgan *et al.*, 2015).

CadC aus *E. coli* fungiert als pH-Sensor, dessen periplasmatische Cysteine bei niedrigen pH-Werten reduziert vorliegen, wodurch es zur Dimerisierung und Aktivierung des DNA-bindenden Transkriptionsfaktors beim Vorhandensein von Lysin kommt. Übereinstimmend mit PdeC und im Gegensatz zu TcpP und ToxR ist hier die Reduktion der DSB ausschlaggebend für die funktionale Aktivierung, wenngleich es sich bei PdeC um eine enzymatische Reaktion handelt, während CadC einen Transkriptionsaktivator darstellt. Die Regulation von CadC beinhaltet keine proteolytischen Prozesse. Der Mangel an Lysin führt in Verbindung mit dem pH-Wert über eine direkte Interaktion mit LysP zur Inaktivierung der Signalkaskade (Tetsch and Jung, 2009).

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Regulation von zellulären Prozessen durch einen Thiol-Disulfid-Switch nicht ungewöhnlich ist und besonders bei Transkriptionsfaktoren eine große Rolle spielt. Diese können sich im Periplasma befinden und die Genexpression steuern, sind aber auch im Cytoplasma zur Bekämpfung von ROS relevant (siehe Abschnitt 1.4.3). Eine durch Redoxsignale ausgelöste enzymatische Reaktion, wie im Fall der c-di-GMP degradierende PDE PdeC, stellt abhängig vom DSB-System und den HtrA-Proteasen DegP und DegQ, einen neuartigen Regulationsmechanismus im Kontext der sekundären Botenstoffregulation dar.

Die Rolle von DsbA/B im Kontext der Matrixsynthese ist allerdings nicht nur auf die Inaktivierung von PdeC durch Oxidation der konservierten Cysteine beschränkt. So führt dieses System ebenfalls zur Reduktion von CsgD- und Curli-Expression (Abb. 24 B und C). Die erhöhte Matrixproduktion, ausgelöst durch gesteigerte CsgD-Expression in  $\Delta dsbA$ - bzw.  $\Delta dsbB$ -Mutanten, zeigte sich auch in den Makrokolonie-Biofilmen dieser Stämme (Abb. 24 A).

In *Salmonella enterica* wurde dieser Phänotyp bereits beschrieben und ebenfalls mit einer erhöhten Expression von CsgD in Zusammenhang gebracht (Anwar *et al.*, 2014). Untersuchungen von  $\Delta dsbA$ - und  $\Delta dsbB$ -Mutanten in *E. coli* führten zu ähnlichen Resultaten bezüglich der Kolonimorphologie, unter den getesteten Bedingungen konnte jedoch kein direkter Einfluss auf den CsgD-Spiegel entdeckt werden. Allerdings stellte sich heraus, dass die Inhibierung der membrangebundenen DGC DgcN (YfjN) durch ihren Antagonisten YfiR abhängig von dem oxidierenden DsbA/DsbB-System ist (Hufnagel *et al.*, 2014). Demnach erfordert die korrekte Faltung von YfiR, DsbA und DsbB. Normalerweise produziert DgcN nur geringe Mengen c-di-GMP, welche an der Expression von wildtypischen Mengen CsgD beteiligt sind. Fehlt der Inhibitor YfiR oder kann er durch das Fehlen von DsbA nicht mehr korrekt gefaltet werden, kommt es zur Dimerisierung und Hyperaktivierung von DgcN. Das Resultat ist eine CsgD- und AdrA-unabhängige Expression von Cellulose, womöglich durch die hohen lokal generierten c-di-GMP-Mengen (Hufnagel *et al.*, 2014).

Auch in *S. enterica* wurde gezeigt, dass die Biofilmbildung abhängig vom Redoxzustand periplasmatischer Proteine ist. Erhöhte Matrixproduktion in DsbA/DsbB-Mutanten korreliert hier mit erhöhter CsgD- und CsgA-Expression und ist abhängig von den GGDEF/EAL-Proteinen YhjK und YdiV (Anwar *et al.*, 2014). Wie das DsbA/B-System, vermittelt durch die c-di-GMP-modulierenden Enzyme, geringere CsgD-Expression induziert konnte hier noch nicht final geklärt werden. Es liegt jedoch nahe, dass eine Veränderung des Elektronenflusses in DsbA/B-Mutanten Einfluss auf die Bildung von DSB in den membranständigen Proteinen YhjK und YdiV hat, was zu Funktionsverlust und erhöhten CsgD-Spiegeln in *S. enterica* führt. In *E. coli* wirkt PdeK (YhjK) spezifisch auf die Cellulosesynthase (Anja Richter und Regine Hengge, unveröffentlicht), während RflP (YdiV) durch Bindung an den FlhDC-Komplex die Transkription der flagellaren Klasse 2 Gene unterbinden kann (Wada *et al.*, 2012). Ein Zusammenhang mit der Expression von CsgD, sei es über c-di-GMP, das DsbA/B-System oder unabhängig davon, konnte noch nicht hergestellt werden. Für die DsbA/B-abhängige Reduktion der Matrixsynthese über CsgD in *E. coli* ist eine Modulierung der c-di-GMP Konzentration, durch bestimmte DGCs oder PDEs, ebenfalls denkbar. Das oben genannte Beispiel DgcN liefert erste Hinweise in diese Richtung.

Die CSS-PDE PdeC liegt in einer  $\Delta dsbA$ -Mutante vornehmlich reduziert und damit aktiv vor, was nicht mit der erhöhten Matrixproduktion dieses Stammes korreliert, daher scheint PdeC unter diesen Bedingungen nicht zu der erhöhten CsgD-Expression beizutragen. Andererseits könnte die unter diesen Umständen stark aktive Cyclase DgcN den Effekt von PdeC kompensieren, damit bliebe die c-di-GMP-Konzentration unverändert bzw. würde je nach Expressionsmengen der Enzyme steigen oder abfallen.

## 5.2 Einfluss proteolytischer Prozessierung und Dimerisierung auf die PdeC-Aktivität

Unfähig zur Bildung einer intramolekularen DSB, innerhalb der CSS-Domäne, wird die PdeC<sup>ASS</sup>-Variante im wildtypischen *E. coli* Stamm sehr effizient abgebaut. Es kommt zur Akkumulation eines Fragments welches lediglich aus der 2. Transmembrandomäne und der cytoplasmatischen EAL-Domäne von PdeC besteht. In einem *degP/degQ*-negativen Hintergrund findet keinerlei Proteolyse mehr statt, ersatzweise kommt es vermehrt zur Dimerisierung von PdeC durch das verbleibende konservierte Cystein (Abb. 15 A). Damit stellt PdeC ein Substrat von DegP und DegQ dar und stützt damit die Hypothese der gemeinsamen Substratspezifität (siehe Abschnitt 1.4.2). Erst kürzlich konnte ein weiteres Substrat gemeinschaftlicher DegP- und DegQ-vermittelter Proteolyse identifiziert werden. In pathogenen Stämmen wie *S. typhimurium*, *S. flexneri* und auch *E. coli* (EPEC) sind beide Proteasen für den Abbau von E-Cadherin während der Infektion verantwortlich. Bei der Kolonisierung des Darms führt die Zerstörung des Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Membranproteins wahrscheinlich zu einem leichteren Eindringen der Erreger über das polarisierte Epithel in die Wirtszelle. Dass DegP in die Mikroumgebung des Darms sekretiert wird und dort das Adhäsionsprotein E-Cadherin schneidet, wurde bereits in einigen gram-positiven und auch gram-negativen Enterobakterien untersucht. Diese Protease dient daher nicht nur zur Erhaltung der Proteinhomöostase unter Hitzeschockbedingungen, sondern ist auch an der Virulenz beteiligt (Abfalter et al., 2016).

DSB-freies PdeC<sup>ASS</sup> zeigt eine stärkere enzymatische Aktivität als die noch zur Ausbildung einer DSB fähigen PdeC<sup>wt</sup>-Variante. Dies spiegelt zum einen die stärker reduzierte Matrixsynthese in Makrokolonien wider, zum anderen werden auch CsgD- und *csgB::lacZ*-Expression von der Mono-Cystein-Variante stärker reduziert (Abb. 10, Abb. 22 und Abb. 23). Hinzu kommt, dass die erhöhte Celluloseproduktion Eisen-gestresster Kolonien durch das PdeC<sup>wt</sup>-Plasmid nicht unterbunden werden kann, während die DSB-defiziente PdeC<sup>ASS</sup>-Variante auch hier zu unstrukturierten Makrokolonie-Biofilmen führt (Abb. 30 und Abb. 31). In diesem Kontext ist es durchaus vorstellbar, dass PdeC eine lokale Wirkung auf die Cellulosesynthase hat. Das bedeutet, die Aktivität von periplasmatisch reduziertem PdeC würde die Aktivität der Cellulose-spezifischen Cyclase DgcC antagonisieren, was auch unabhängig von CsgD zu verminderter Produktion dieser Matrixkomponente führt. Ein Zusammenspiel mehrerer membrangebundener PDEs und DGCs könnte demnach zu einer feinregulierten Synthese von Cellulose unter spezifischen Umweltbedingungen beitragen. Die Analyse der Deletion von  $\Delta degP$  und  $\Delta degQ$  in Makrokolonien gab zudem Aufschluss über die Aktivität von nicht prozessiertem PdeC<sup>ASS</sup> und zeigte, dass die Aktivierung der enzymatischen Aktivität der EAL-Domäne unabhängig von der Prozessierung erfolgt (Abb.

16). PdeC<sup>ASS</sup> ist also auch in seiner Gesamtgröße als PDE aktiv, damit ist nicht die Proteolyse Auslöser für die Aktivierung von PdeC, sondern die Reduktion der konservierten Cysteine im Periplasma. Durch das Reduktionsreagenz DTT konnte auch in der PdeC<sup>wt</sup>-Variante Abbau beobachtet werden (Abb. 11 B), chromosomal Flag-getaggtetes PdeC Protein wurde in einer  $\Delta dsbA$ -Mutante ebenfalls degradiert (Abb. A 1). Demnach ist die Proteolyse weder das Resultat der Generierung einer Mono-Cystein-Variante, noch der moderaten Überexpression von dem Niedrigkopien-Vektor pCAB18.

Bezüglich der Aktivität wurde beobachtet, dass erst die Integration in die Membran durch die TM2 zum vollen Ausmaß enzymatischer Aktivität führt. Bezeichnend dafür ist die noch strukturierte Oberfläche einer Makrokolonie mit PdeC EAL-Plasmid im Gegensatz zur völlig flachen und weißen Kolonie der TM2+EAL-Variante ( Abb. 18 B). *In vitro* Analysen zeigten zudem, dass PdeC in einer membranösen Umgebung unter oxidierenden Bedingungen keinerlei enzymatische Aktivität besitzt. Erst die Reduktion durch DTT führt zum Abbau von c-di-GMP, wobei die Effektivität der c-di-GMP-Hydrolyse verglichen mit dem löslichen EAL-Konstrukt oder den Detergenzvarianten noch gesteigert wird (Abb. 25). Konkret heißt das, dass in Detergenz unter oxidierenden Bedingungen zwar alle PdeC-Konstrukte aktiv sind, aber c-di-GMP nur zu pGpG abbauen können. Das gleiche gilt auch für die lösliche EAL-Domäne. In Nanodisc eingelagertes PdeC<sup>wt</sup>-Protein, sowie auch TM2+EAL-Fragment bauen c-di-GMP bis hin zu GMP ab. Eingelagert in Nanodisc, unter reduzierenden Bedingungen ist die PdeC TM2+EAL-Variante jedoch aktiver als die PdeC<sup>wt</sup>-Variante (Abb. 25 A). Dies spiegeln auch die Phänotypen der entsprechenden Makrokolonien wider, was darauf schließen lässt, dass die periplasmatische Domäne und die 1. Transmembrandomäne eine inhibierende Wirkung auf die PDE-Aktivität haben und die Aktivität von PdeC durch DegP/DegQ-vermittelte Proteolyse gesteigert werden kann (Abb. 18 B).

Die *in vitro* Experimente zeigen eine redox-abhängige Regulation von PdeC<sup>wt</sup>, aber auch des TM2+EAL-Fragments. Das heißt, für die Aktivität von PdeC ist nicht nur die Reduktion der periplasmatischen Cysteine, die erst zu der Entstehung des TM2+EAL-Fragments führt, von Bedeutung. Ebenso müssen die Cysteine der membrangebundenen EAL-Domäne im reduzierten Zustand sein. Das Cytoplasma stellt eine eher reduzierende Umgebung dar, wonach die EAL-Domäne unter stressfreien Bedingungen hier vorwiegend in einem aktiven Zustand vorliegt. Hier zeigt sich dennoch ein interessanter zweiter Regulationsmechanismus, denn es ist durchaus vorstellbar, dass bei oxidativem Stress im Cytoplasma die Aktivität von PdeC durch die Cysteine der EAL-Domäne inhibiert wird.

Liegt die EAL-Domäne löslich vor, ist die Aktivität unabhängig vom Redoxzustand, die Effizienz der Hydrolyse von c-di-GMP jedoch auch geringer. Die Bindung der EAL-Domäne, durch die TM2 an die Membran, macht diese demnach in Abhängigkeit vom Redoxstatus regulierbar.

Durch Dimerisierung induzierte Konformationsänderungen können einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von PDEs haben, wie bereits in dem *E. coli* Protein PdeL (YahA) gezeigt werden konnte. Hier führt die Dimerisierung zu einem verstärkten Umsatz des c-di-GMP-Substrats (Sundriyal et al., 2014). Auch für PdeC, insbesondere für die reduzierte Variante, konnte eine Dimerisierung durch die 2. Transmembrandomäne nachgewiesen werden. In der AG Hengge wurden dazu Protein-Protein-Interaktionsuntersuchungen mittels BACTH-Experimenten angestellt, welche auch PdeC beinhalteten (Olga Sarenko und Regine Hengge, unveröffentlicht). Dabei wurde festgestellt, dass sowohl PdeC-Wildtypprotein als auch die PdeC<sup>ASS</sup>-Variante miteinander interagieren. Für PdeC<sup>ASS</sup> konnte das bereits in den Immunoblots beobachtet werden und wurde auf die Bildung einer DSB zurückgeführt (Abb. 11). Im Vergleich zu der Interaktion der DSB-defizienten PdeC<sup>ASS</sup>-Variante sowie der TM2+EAL-Variante war die Interaktion der Wildtypproteine jedoch schwächer. Das alleinige EAL-Fragment, sowie der Austausch der 2. Transmembrandomäne durch TM2\* aus LacY, führte indes zu keinerlei Interaktion. Die TM2 in PdeC ist daher nicht nur essentiell für Stabilität und Aktivität des Proteins, sondern auch für die Dimerisierung der membranständigen PdeC-Varianten (Abb. 18). Die deutlich stärkere Interaktion von PdeC<sup>ASS</sup>, sowohl im Wildtyphintergrund als auch in der  $\Delta degP/\Delta degQ$ -Mutante zeigte zudem, dass es unabhängig von der Proteolyse vornehmlich zur Dimerisierung kommt, wenn die konservierten Cysteine in ihrer freien Thiol-Form vorliegen (Olga Sarenko und Regine Hengge, unveröffentlicht). Außerdem sind beide konservierten Cysteine in der interagierenden PdeC<sup>wt</sup>-Variante noch vorhanden, was die Dimerisierung als Artefakt einer periplasmatischen Mono-Cystein-Variante ausschließt.

Trägt man alle Daten zusammen, ergibt sich ein komplexer Regulationsmechanismus, der die Aktivierung von PdeC durch zwei Mechanismen nahelegt. (1) Reversible Aktivierung und Dimerisierung von PdeC-Wildtypprotein mit der Möglichkeit zur erneuten Inaktivierung durch DsbA/B-vermittelte Oxidation. (2) Irreversible Aktivierung durch proteolytische Prozessierung und Dimerisierung eines membranständigen Fragments aus TM2- und EAL-Domäne.

Natürlich muss sich die Zelle dieses konstant aktiven Enzyms auch wieder entledigen können, daher ist die weitere Degradierung des TM2+EAL-Fragments ebenfalls von großer Wichtigkeit. Bereits das klonierte TM2+EAL-Konstrukt zeigte im Immunoblot eine weitere Abbaubande, welche auf Höhe des EAL-Konstrukts zu finden war und somit Prozessierung auf der cytoplasmatischen Seite anzeigt (Abb. 18 A). Die Menge des EAL-Konstrukts selbst nimmt in der späten stationären Phase (über Nacht) im Vergleich zur postexponentiellen Wachstumsphase stark ab. Das heißt, die Zelle ist sehr wohl in der Lage DegP/Q-prozessiertes PdeC weiter abzubauen, die Effektivität der cytoplasmatischen Proteasen scheint in diesem Fall jedoch geringer zu sein, sodass es zu einer Akkumulierung des TM2+EAL-Fragmentes kommt.

Schlussendlich ist die Aktivitätskontrolle von PdeC eng mit komplexen proteolytischen Prozessen verbunden, in die DegP und DegQ auf der periplasmatischen Seite involviert sind und weitere noch nicht identifizierte Proteasen an der Innenseite der Membran sowie im Cytoplasma. Am Abbau von Membranproteinen oder bereits teilweise degradierten membranständigen Proteinüberresten sind häufig sog. „site-2“-Proteasen (S2P) beteiligt. Diese prozessieren vor allem membranständige Transkriptionsfaktoren, aber auch die Produktion von Pheromonen in *E. faecalis*, die Prozessierung von Signalpeptiden durch RseP und die Cytokinese in *C. crescentus* werden durch S2P vermittelt (Schneider and Glickman, 2013). Die weitere Prozessierung des PdeC TM2+EAL-Fragments könnte daher auch durch die Aktivität solcher Proteasen gesteuert werden.

Die Regulation durch sequentielle Proteolyse generell konnte schon bei einigen zellulären Prozessen beobachtet werden. Die Inaktivierung des anti- $\sigma^E$ -Faktors RseA bei der Antwort auf Zellhüllstress in *E. coli* basiert auf eben solchem Abbau und beinhaltet die Proteolyse im Periplasma durch DegS und RseP, während auf der cytoplasmatischen Seite das ClpXP/Lon-System für die Freilassung von RpoE ins Cytosol sorgt (Alba and Gross, 2004; Ehrmann and Clausen, 2004; Ades, 2008). Auch die Inaktivierung der membranständigen Transkriptionsfaktoren ToxR und TcpP aus *Vibrio cholerae* verläuft über einen vielschichtigen Abbau durch diverse Proteasen (Teoh *et al.*, 2015; Almagro-Moreno *et al.*, 2015). Sequentielle Proteolyse ist offensichtlich ein effizienter und auf mehreren Ebenen regulierbarer Prozess zur Aktivierung (PdeC) oder Inaktivierung (RseA, TcpP, ToxR) von membranständigen Proteinen in Bakterien. Dabei kann die Effektivität der Proteolyse von der spezifischen Signalwahrnehmung des Substrat-Proteins abhängen, die zu einer veränderten Struktur führen und somit die Zugänglichkeit zum Substrat beeinflussen kann. Natürlich spielt auch die Verfügbarkeit der Proteasen eine Rolle bei der Regulierung ihres Substrats. DegP wird  $\sigma^E$ -abhängig bei Zellhüllstress induziert, während DegQ in der vegetativen Wachstumsphase vorkommt. Proteasen können jedoch auch durch spezifische Signale wie ungefaltete oder aggregierte Proteine, die plötzlich in der Zelle akkumulieren, sequestriert werden. Das Zusammenspiel von Proteolyse und Dimerisierung bietet der Zelle also die Möglichkeit, die Funktion und Aktivität eines Proteins vielschichtig zu kontrollieren. Reduziertes PdeC kann demnach in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von DegP und DegQ sowie weiterer cytoplasmatischer Proteasen in einer reversibel (wt) oder irreversibel (TM2+EAL) aktiven Form vorliegen oder durch weitere proteolytische Prozesse inaktiviert werden.

### 5.3 Die Wirkung redox-relevanter Umweltbedingungen auf die Matrixsynthese und die Regulation von PdeC

Externe Umweltbedingungen, wie starke Lichteinstrahlung in der Anwesenheit von Sauerstoff oder hohe Konzentration an freiem reduziertem Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ), können zur Störung des Redoxhaushaltes in den Zellkompartimenten führen. Sowohl Licht als auch  $\text{Fe}^{2+}$  können, bei den fakultativ anaerob lebenden *E. coli* Bakterien, in Gegenwart von Sauerstoff zur Entstehung von oxidativem Stress beitragen. Zweiwertiges Eisen führt über die Fenton-Reaktion zur Bildung stark reaktiver Hydroxyl-Radikale, während Licht durch Photooxidation reaktive Sauerstoffspezies generieren kann (Blanchard *et al.*, 2007; Touati, 2000b; Scoffone *et al.*, 1970). Besonders sensibel gegenüber Redoxveränderungen sind die Thiolgruppen von Cysteinen. Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits beschrieben, liegen die konservierten Cysteine von PdeC, in seinem inaktiven Zustand durch DsbA/B oxidiert als Disulfidbrücke vor, während die reduzierte, freie Thiol-Form aktiv ist und von den periplasmatischen HtrA-Proteasen DegP und DegQ abgebaut werden kann.

Die initialen Experimente zur Analyse der Matrixkomposition von Makrokolonien wurden auf Yesca-Medium durchgeführt, welches im Vergleich zu LBnoS zu eher wenig strukturierten Kolonien führt (Abb. 30 A). Dieser Verlust an Matrixbildung kann Resultat der verminderten Curli-Expression unter diesen Bedingungen sein, wobei die Proteinmenge des Biofilmregulators CsgD unverändert ist (Abb. 30 B und C). Die Regulation von CsgD ist komplex und beinhaltet diverse Transkriptionsfaktoren und kleine RNAs, die auf der Ebene von Genexpression und Translation die Proteinmenge an entsprechende Umweltbedingungen adaptieren können (Mika & Hengge, 2013; Ogasawara *et al.*, 2010; Gerstel *et al.*, 2006). Mechanismen, welche post-transkriptionell CsgD-Aktivität oder Proteinmenge, beispielsweise durch Proteolyse beeinflussen, sind noch nahezu unbekannt. Eine Option zur Erklärung von veränderter Curli-Expression, bei gleichbleibenden CsgD-Proteinmengen, wäre die Inaktivierung durch Phosphorylierung des Proteins wie es in Simm *et al.* für *Salmonella enterica* beschrieben wurde (Simm *et al.*, 2014).

Durch die Behandlung mit Eisen kommt es hingegen auch auf Yesca-Medium zur Ausbildung einer komplexen 3D-Struktur mit vielen kleinen Fältchen. Diese Morphologie entspricht jedoch nicht völlig einem wildtypischen Makrokolonie-Biofilm des Cellulose- und Curli-produzierenden AR3110 Stammes auf Trypton-haltigem LBnoS-Medium. Eher spiegelt sie den Phänotypen eines *csgB*-negativen Stammes wider, welcher ausschließlich Cellulose als Hauptmatrixkomponente produziert (Abb. 7). Im Einklang mit dieser Beobachtung ist die konstant niedrige Expression der *csgB::lacZ*-Fusion nach und vor der Eisenbehandlung, wie bereits zuvor beschrieben (Abb. 30 C).

Die Deletion der Cellulose-spezifischen Diguanylatcyclase DgcC hebt die verstärkte Struktur einer mit Eisen-behandelten Kolonie auf Yesca wieder auf und weist daher explizit auf eine erhöhte Produktion dieser Matrixkomponente bei FeCl<sub>2</sub>-Stress hin (Abb. 30 A). Die Induktion der Matrixsynthese durch Eisen und oxidativen Stress konnte bereits mit der Verwendung von FeCl<sub>3</sub> und dem redox-aktiven Antibiotikum Phenanzin in dem uropathogenen *E. coli* Stamm UT189 gezeigt werden (Depas et al., 2013). Ein Zusammenhang mit der Produktion von Cellulose wurde jedoch nicht hergestellt.

Die Behandlung von Makrokolonien mit reduziertem Eisen in Form von FeCl<sub>2</sub> zeigt, dass PdeC unter wildtypischen Bedingungen tatsächlich überwiegend in seiner inaktiven DSB-Form vorliegen muss (siehe Abschnitt 4.5.2.2). Wurde die CSS-Domäne von PdeC in einen irreversibel reduzierten Zustand, durch die Mutation eines oder beider konservierter Cysteine versetzt, führte die PDE-Aktivität zu einer flachen Kolonie trotz Behandlung mit FeCl<sub>2</sub> (Abb. 31). Folglich ist konstant reduziertes PdeC, exprimiert von einem Niedrigkopien-Vektor, in der Lage den Anstieg der Cellulosesynthese durch FeCl<sub>2</sub> zu unterbinden. Unter Wildtypischen Bedingungen liegt die CSS-Domäne von PdeC durch das DsbA/DsbB-System bereits vorwiegend oxidiert vor. Demnach kann mit dem PdeC<sup>wt</sup>-Plasmid keine oder nur eine geringe Änderung der Koloniemorphologie im Vergleich zum Leerplasmid beobachtet werden.

Die geringe Änderung könnte mit der Heterogenität einer Makrokolonie zusammenhängen. Diese besteht aus vielen Bakterienzellen in unterschiedlichen physiologischen Zuständen u.a. ausgelöst durch Nähr- und Sauerstoffgradienten (Serra and Hengge, 2014). Daher ist es wahrscheinlich, dass die konservierten Cysteine von PdeC nicht in allen Zellen der Kolonie den gleichen Redoxzustand haben, sondern vielmehr je nach Lage im Biofilm reduziert oder oxidiert sind, was sich entsprechend auf die Aktivität der EAL-Domäne und somit die Matrixsynthese auswirkt. Durch die Behandlung mit FeCl<sub>2</sub> versetzt man nun alle Zellen in einen Zustand, in denen C75 und C106 oxidiert und PdeC damit inaktiv vorliegt, wodurch es zu vermehrter Matrixproduktion kommt, auch diese welche sich unter unbehandelten Kontrollbedingungen in einem anaeroben Bereich im unteren teil der Makrokolonie befinden. Hier könnte PdeC, aufgrund fehlenden Sauerstoffs als Elektronenakzeptor, vornehmlich reduziert und somit aktiv vorliegen.

PdeC ist nicht die einzige CSS-PDE, die durch Oxidation inaktiviert werden könnte, so wurde für PdeB und PdeG ein ähnlicher Effekt beobachtet (Martin Lorkowski und Regine Hengge, unveröffentlicht). Additiv könnten unter stark oxidierenden Bedingungen im Periplasma DGCs wie DgcC oder DgcN vermehrt zur Stimulation hoher c-di-GMP Spiegel beitragen und zur Aktivierung der Cellulosesynthase führen. Die Cellulosesynthase BcsA ist ein c-di-GMP-bindendes PilZ-Domänenprotein, welches im Vergleich zu anderen wie YcgR oder PdeR eine sehr niedrige Bindeaffinität für c-di-GMP hat (Pultz et al., 2012; Lindenberg



*et al.*, 2013). Während die Produktion oder Funktionalität von Flagellen durch YcgR oder die Synthese von Curli-Fasern indirekt über PdeR nur geringe Konzentration des sekundären Botenstoffes zur Bindung an die PilZ-Domäne und der damit verbundenen Aktivierung der Proteine erfordert, werden im Fall von BcsA stark erhöhte c-di-GMP Mengen benötigt, die sehr wahrscheinlich nur lokal generiert werden können (Anja Richter und Regine Hengge, unveröffentlicht). DgcC und DgcN sind membranständige c-di-GMP-synthetisierende Enzyme, die in der Lage sind solche Mengen herzustellen (Hufnagel *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2006). Die Feinregulierung der Cellulosesynthese könnte demnach durch diverse membranständige DGCs und PDEs gewährleistet werden, die in Abhängigkeit ihrer Sensordomänen unter verschiedenen Bedingungen aktiv sind und zum c-di-GMP-Pool um BcsA beitragen.

Zunächst führte, ähnlich wie bei der Verwendung von Yesca-Medium, auch die Bestrahlung mit Licht zu einer unstrukturierten Koloniemorphologie auf LBnoS-Agarplatten. Allerdings wird dieser Phänotyp maßgeblich durch reduzierte CsgD-Mengen bestimmt, die sich in stark erniedrigter Curli- und DgcC-Expression widerspiegeln (Abb. 26). Nur die Deletion von 4 c-di-GMP-spezifischen PDEs, unter allen 29 GGDEF- und EAL-Domänenproteinen, führte unter diesen Bedingungen zu einer Kolonie mit aufgefalteter Oberflächenstruktur. Dabei konnte durch den Verlust von *pdeR* mit nahezu wildtypischer Koloniemorphologie der stärkste Effekt beobachtet werden. Eine  $\Delta pdeK$ -Mutante zeigte nur vermehrte Aufwölbungen im Zentrum der Kolonie,  $\Delta pdeC$ - und  $\Delta pdeO$ -Mutanten hingegen eine spezielle 3D-Struktur wie sie auch in einem ausschließlich Cellulose-produzierenden Stamm oder einer  $\Delta dgcM$ -Mutante zu beobachten sind (Abb. 27 und vgl. Abb. 7).

Die Deletion des *pdeR*-Gens führt unabhängig von der Lichtbestrahlung auch bei im Dunkeln herangezogenen Kolonien zu einer veränderten Koloniemorphologie. Das Trigger-Enzym PdeR verhindert bei niedrigen c-di-GMP-Konzentrationen die Aktivierung von CsgD durch MlrA und DgcM (Lindenberg *et al.*, 2013). Fehlt das Protein, kommt es demnach auch bei einem geringen c-di-GMP-Spiegel, wie in exponentiell wachsenden Zellen, zur Expression von CsgD und Matrixsynthese. Eine Makrokolonie mit derart erhöhter Matrixproduktion führt zu einem veränderten Phänotyp, der sich in Dunkelheit durch ein flaches Erscheinungsbild mit einigen hohen Stegen auszeichnet. Bei Lichteinwirkung wird phänotypisch eine Wildtyp-ähnliche Matrixproduktion erreicht, wie sie für den AR3110 Stamm in Dunkelheit bekannt ist (Abb. 27). Der Phänotyp der  $\Delta pdeR$ -Mutante unter Lichtbestrahlung, wird daher sehr wahrscheinlich primär durch die erhöhte CsgD Transkription ausgelöst.

Die Ursache für den Effekt der Gendelektionen, welche für die PDEs PdeC, PdeK und PdeO kodieren, ist allerdings in der Signalkaskade unterhalb von PdeR zu suchen. In Dunkelheit gewachsene Makrokolonie-Biofilme dieser Mutanten zeigen keine oder nur geringe

Veränderungen, während Lichtstress eindeutig zu einer stark veränderten Oberflächenstruktur führt. Jedoch scheint nicht eines dieser Proteine allein die Reduktion der Matrixsynthese unter Lichteinfluss zu verantworten, vielmehr werden alle 3 PDEs ihren Beitrag dazu leisten müssen.

PdeO (DosP) besitzt eine Häme-basierte PAS-Domäne, über die es Sauerstoffveränderungen wahrnehmen und darauf reagieren kann. In einem Komplex mit DgcO (DosC) kontrolliert dieses System den Abbau und die Produktion von c-di-GMP und führt damit zu einer Feinregulierung der Matrixsynthese bei veränderter Sauerstoffverfügbarkeit. Sauerstoff kann nur an den reduzierten Häme-Liganden, also  $\text{Fe}^{2+}$  binden, was zu erhöhter enzymatischer Aktivität der EAL-Domäne führt. Außerdem trägt eine redox-abhängige Modifikation spezifischer Cysteinreste zur Erhöhung der PDE-Aktivität bei (Takahashi *et al.*, 2012; Tuckerman *et al.*, 2009). Die Redoxregulation von PdeO ist also bereits bekannt, daher könnte auch durch Licht ausgelöster Redoxstress zu einer Reduktion der Matrixsynthese über dieses System führen.

Die Wirkungsweise von PdeK ist noch nicht genau geklärt, es besitzt allerdings zwei Cysteine, eines in jeder Transmembrandomäne, welche redox-abhängig zur Regulation der PDE-Aktivität beitragen könnten.

Für PdeC wurde in dieser Arbeit eine Regulation der enzymatischen Aktivität in Abhängigkeit vom Redoxzustand der konservierten periplasmatischen Cysteine gezeigt. Für PdeO ist bekannt und für PdeC wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass es zu einer Reprimierung der enzymatischen Aktivität durch Oxidation kommt. Die Betrachtung der Makrokoloniemorphologie zeigte hingegen eine Aktivierung der PDE-Aktivität unter Lichtbestrahlung, welche photooxidativen Stress erzeugen kann. Ob es unter diesen Bedingungen möglicherweise indirekt zu einer Reduktion dieser Proteine kommt, bleibt zu klären und soll Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Nichtsdestotrotz hat Licht eine Wirkung auf die Expression von PdeC wie anhand von Reportergenfusionen und Immunoblotuntersuchungen gezeigt werden konnte (Abb. 28 und Abb. 29 A). Des Weiteren geht die erhöhte Produktion von PdeC einher mit verringerten CsgD-Proteinmengen. Dies führt zu der Annahme, dass Licht die Expression von PdeC steigert, wodurch c-di-GMP-Spiegel reduziert werden, was verringerte CsgD-Spiegel und Matrixproduktion zur Folge hat (Abb. 29 B).

Der genomische Kontext von PdeC zeigt hierzu einen potentiellen regulatorischen Aspekt, mit dem sich Sara Alina Neumann in ihrer Masterarbeit genauer befasst hat. Direkt konvergent zu *pdeC* liegt das *soxS*-Gen, dessen Transkription von SoxR gesteuert wird. Die Oxidation durch redox-aktive Komponenten wie Hydroxyl-Radikale führt zur Aktivierung von SoxR und der Expression von *soxS*. SoxS selbst ist ebenfalls ein Transkriptionsaktivator und bringt mehr als 100 Gene zur Expression, welche für diverse Proteine mit antioxidativer

Kapazität kodieren (Touati, 2000a). Sowohl *pdeC* als auch *soxS* weisen keinen Transkriptionsterminus auf, was bei der Anordnung dieser Gene zu einem Antisense-Mechanismus der überlappenden Transkripte durch komplementäre Basenpaarung führen könnte. Die Ausbildung einer doppelsträngigen RNA könnte folglich die Stabilität der Transkripte beeinflussen. Die Arbeit von Sara Alina Neumann hat gezeigt, dass die gegenläufige Expression von *soxS* das *pdeC*-mRNA-Transkript stabilisiert. Allerdings ist dieser Antisense-Mechanismus nur in *cis* möglich, da ein Einfluss auf die anderswo im Chromosom liegende *pdeC::lacZ*-Fusion nicht nachgewiesen werden konnte (Sara Alina Neumann, Susanne Herbst und Regine Hennege unveröffentlicht). Es ist also durchaus denkbar, dass photooxidativer Stress die Expression von *soxS* aktiviert. Die Stabilisierung der *pdeC*-mRNA durch das entstehende *soxS*-Transkript könnte dann zu erhöhten PdeC Proteinmengen führen.

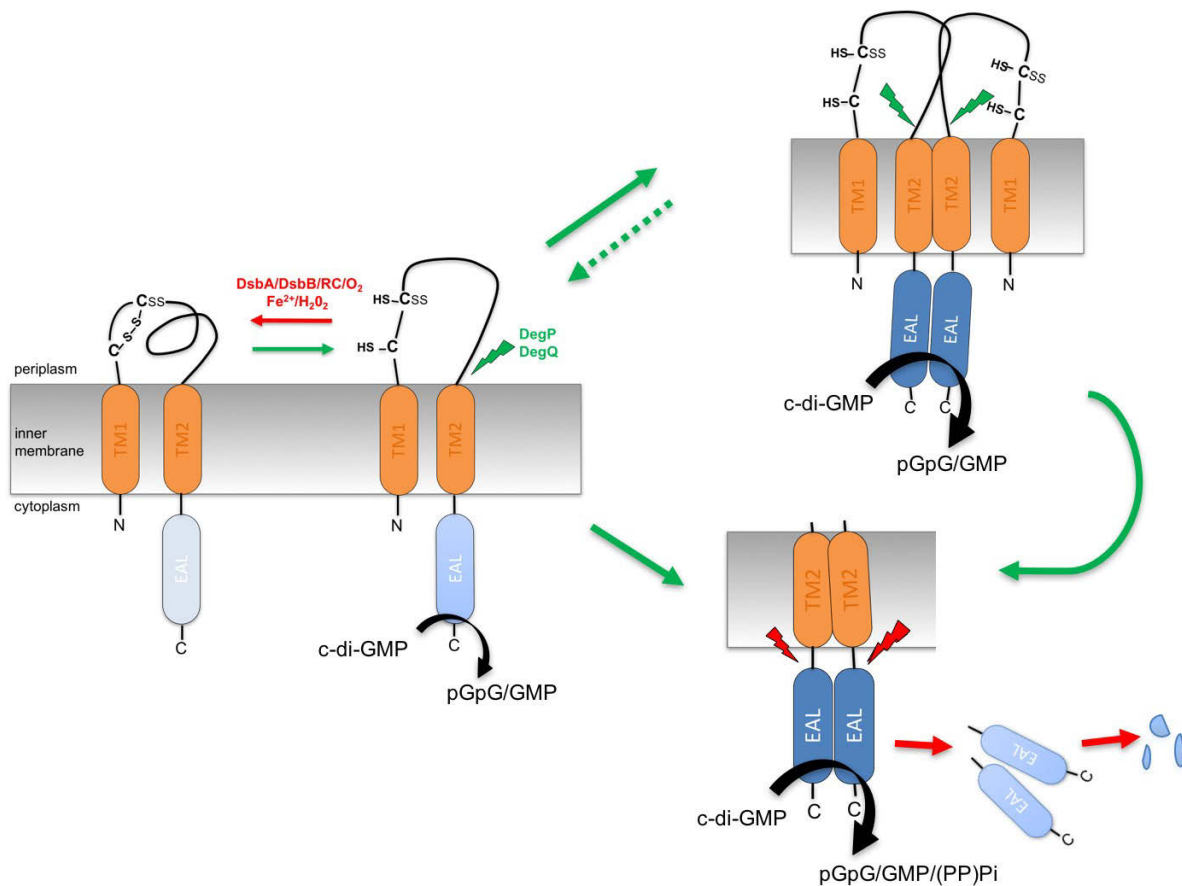
Für das PdeC-Homolog aus *Klebsiella pneumoniae* konnte eine direkte Abhängigkeit der Expression von RpoS und SoxRS durch qRT-PCR gezeigt werden. Auch das ROS-induzierende Agens Paraquat führte in diesen Untersuchungen zu erhöhten *pdeC*-mRNA-Spiegeln (Huang et al., 2013). In diesem Zusammenhang durchgeführte Experimente zeigten jedoch keinen Einfluss einer  $\Delta$ *soxRS*-Mutation auf die Expression einer *pdeC::lacZ*-Reportergenfusion bzw. führte Paraquat auch nicht zur Veränderung der Makroloniemorphologie einer  $\Delta$ *pdeC*-Mutante (Abb. A 2 und Abb. A 3). Die Abweichungen in der Aminosäuresequenz der PdeC-Homologe aus *K. pneumoniae* und *E. coli* sind vergleichsweise groß und beinhalten eine Deletion von 20 Codons direkt am Anfang des ORF, daher ist eine unterschiedliche Regulierung beider Gene nicht unwahrscheinlich (Abb. 9).

PdeC biete viele Angriffspunkte zur Feinregulierung der Matrixsynthese durch redox-relevante Umweltbedingungen. Durch Lichtbestrahlung kann die Expression von PdeC erhöht werden, was zu verstärktem Abbau von c-di-GMP und CsgD-abhängiger verminderter Matrixsynthese führt. Eisen-induzierten Stress wirkt weitestgehend unabhängig von PdeC, da es unter wildtypischen Bedingungen bereits vorwiegend im oxidierten Zustand und damit inaktiv vorliegt. Aktivierende reduzierende Bedingungen, welche sich direkt auf den Redoxzustand und somit den Aktivitätszustand von PdeC auswirken, konnten in dieser Arbeit noch nicht identifiziert werden und sollen der Fokus bei zukünftigen Untersuchungen sein.

## 5.4 Das Konzept der redox-abhängigen Regulation von c-di-GMP in Bakterien

Die Entstehung einer Disulfidbrücke durch Oxidation zweier benachbarter Cysteinreste ist reversibel und kann daher vortrefflich zur Regulation von Proteinfunktionen genutzt werden. Thiol-basierte Redoxsensoren sind weit verbreitet und dienen vornehmlich der Entgiftung der Zelle, indem sie als Transkriptionsfaktoren diverse Gene zur Expression bringen, die in der Lage sind schädliche Sauerstoffspezies wieder zu reduzieren (Toledano et al., 1994; Lee et al., 2004; Jung et al., 2011; Hillion and Antelmann, 2015).

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass auch die Aktivität enzymatisch wirkender Proteine wie PDEs durch einen Thiol-Disulfid-Schalter reguliert werden kann. PdeC ist eine von fünf PDEs in *E. coli* K12 mit einem sehr spezifischen Domänenaufbau und zwei hochkonservierten Cysteinen in seiner N-terminalen Sensordomäne, von denen eines in dem namensgebenden CSS-Motiv angeordnet ist. Daher sind alle CSS-PDEs potentiell in der Lage durch Redoxveränderungen die Aktivität ihrer EAL-Domäne zu regulieren. PdeC diente als Prototyp zur Untersuchung des molekularen Mechanismus dieser Gruppe von neuartigen PDEs und zeigte in der Tat eine redox-abhängige Aktivierung seiner enzymatischen Aktivität. Die Wirkungsweise ist komplex und beinhaltet reversible und irreversible Aktivierung verbunden mit Dimerisierung, sowie proteolytischer Prozessierung in mehreren Stufen. Unter Betrachtung aller in dieser Arbeit gesammelten Daten soll daher folgendes Modell zur Redoxkontrolle des sekundären Botenstoffes c-di-GMP über die CSS-PDE PdeC aufgestellt werden (Abb. 33).



**Abb. 33: Modell zur Kontrolle der PDE-Aktivität von PdeC in *E. coli* über den Redoxstatus der periplasmatischen CSS-Domäne.** Von der Zelle neu synthetisiertes und in die Membranintegriertes PdeC kann im Grunde in zwei Zuständen vorliegen. Die konservierten Cysteine der CSS-Domäne können: (I) durch das DsbA/DsbB-System oder ROS (Fe<sup>2+</sup> über Fenton Reaktion) oxidiert in einer DSB angeordnet sein. Die dabei entzogenen Elektronen werden dann über die Atmungskette (RC-„respiratory chain“) auf Sauerstoff (O<sub>2</sub>) übertragen. (II) reduziert in ihrer freien Thiolform vorliegen, was zur Dimerisierung des ganzen PdeC Proteins führt und/oder DegP/DegQ-vermittelten Abbau (grüner Blitz), zu einem nach wie vor in der Membran verankertem TM2+EAL Fragment einleitet, welches ebenfalls dimerisiert. Reduktion und Dimerisierung von PdeC gehen einher mit hoher PDE-Aktivität (dargestellt durch dunklere Blautöne) wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch reduziertes Monomeres PdeC eine gewisse enzymatische Aktivität besitzt. Die hohe PDE-Aktivität von reduziertem PdeC erniedrigt die c-di-GMP Konzentrationen in der Zelle und inhibiert damit die Produktion der Matrixkomponenten eines Biofilms. Der Abbau und die damit verbundene Inaktivierung, des durch DegP/DegQ-generierten PdeC TM2+EAL-Fragments, erfordert weitere Prozessierung durch noch unbekannte Proteasen (roter Blitz). Prozesse welche eine aktivierende Wirkung auf die PDE-Aktivität der EAL-Domäne von PdeC haben sind mit grünen Pfeilen gekennzeichnet, inaktivierende Prozesse mit roten Pfeilen.

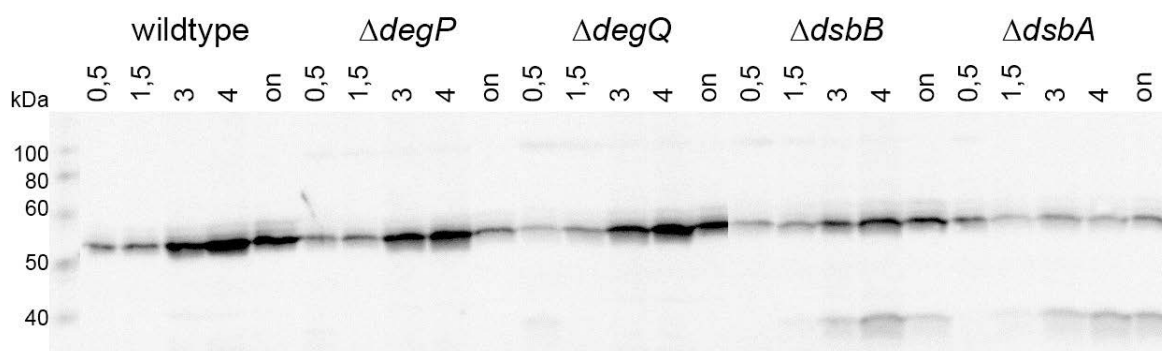
PdeC wird RpoS-abhängig beim Übergang in die Stationärphase exprimiert. Innerhalb einer Makrokolonie wäre PdeC demnach vermehrt in Zellen der oberen Schicht des Biofilms zu finden (Sommerfeldt et al., 2009; Serra et al., 2013b). Im neu synthetisierten PdeC-Protein flankieren zwei Transmembrandomänen (TM1 und TM2) die in das Periplasma ragende CSS-Domäne, während sich die katalytisch aktive EAL-Domäne im Cytoplasma befindet. Die konservierten Cysteine der CSS-Domäne sind in der Lage eine intramolekulare Disulfidbrücke auszubilden. Dieser Prozess wird durch das oxidierende DsbA/DsbB-System

katalysiert und ist verbunden mit einer Reduktion der enzymatischen Aktivität der C-terminalen EAL-Domäne. Die freie Thiol-Form andererseits hat erhöhte PDE-Aktivität und führt zur Aktivierung eines vielschichtigen Prozesses. Die Konformationsänderung der periplasmatischen Schleife erlaubt zum einen die Dimerisierung der TM2-Region von PdeC, andererseits hat der Verlust der stabilisierenden DSB auch die Erkennung durch die HtrA-Proteasen DegP und DegQ zur Folge. Diese prozessieren PdeC zu einem Fragment, welches lediglich die TM2- sowie die cytoplasmatische EAL-Domäne enthält. Auch dieses Fragment dimerisiert über die 2. Transmembrandomäne und zeigt hohe PDE-Aktivität. Während die Aktivierung durch Reduktion und Dimerisierung des vollständigen PdeC-Proteins durch Oxidation rückgängig gemacht werden kann, ist die prozessierte Form zunächst irreversibel aktiv. Erst weitere Abbauprozesse auf der cytoplasmatischen Seite zwischen EAL- und TM2-Domäne führen zur Eliminierung der stark aktiven CSS-PDE PdeC. Die lösliche EAL-Domäne hat nur noch geringe enzymatische Aktivität, kann keine Dimere mehr bilden und wird während des Wachstumsverlaufs nahezu vollständig degradiert (Abb. 18 A). Sequentielle Proteolyse ist ein ubiquitär verwendeter Mechanismus zur Regulation membranständiger Proteine. Im speziellen Fall der CSS-PDE PdeC ist das Zusammenspiel von Verfügbarkeit und Effizienz von periplasmatischen und cytoplasmatischen Proteasen bestimmend für die Kontinuität der enzymatischen Aktivität bei reduzierter CSS-Domäne. Generell betrachtet erlaubt dieser komplexe redox-abhängige Regulationsmechanismus der CSS-PDE den Eingang multipler Signale durch seine akzessorischen Elemente. Denn neben den Proteasen bietet auch das DSB-System mit all seinen Komponenten, in Verbindung mit einem funktionalen Elektronenweiterleitungssystem, einen Angriffspunkt bei der Regulation dieser neuen Art von Sensor-gekoppelten PDEs. Konkret ist hierbei die Frage, welches die natürlicherweise reduzierenden Bedingungen sein könnten, die zu einer Aktivierung von PdeC und damit zu reduzierter Biofilmmatrixsynthese führen könnten. Neben PdeC besitzt *Escherichia coli* K-12 noch vier weitere CSS-Domänen-PDEs (PdeB, PdeD, PdeG und PdeN), einige EHEC und EPEC Stämme kodieren sogar für ein sechstes Protein dieser Klasse (PdeT) (Hengge et al., 2015a; Povolotsky and Hengge, 2015). Sie alle besitzen die beiden charakteristischen Cysteinreste an ähnlichen Positionen innerhalb ihrer CSS-Domäne und können daher potentiell eine periplasmatische DSB ausbilden, welche ihre Aktivität beeinflusst (Abb. 6). Allerdings müssen nicht alle CSS-PDEs unter den gleichen Bedingungen den gleichen Redoxzustand innehaben. Vielmehr können spezifische Redoxpotentiale und eine unterschiedliche Beteiligung des DSB-Systems zur Differenzierung der Aktivitätszustände beitragen. Außerdem muss nicht unweigerlich die reduzierte Form auch der aktiven Form entsprechen, für einige CSS-PDEs könnte folglich Reduktion und/oder Proteolyse auch zur irreversiblen Inaktivierung führen. Die Beteiligung und Effektivität der Proteasen und die damit verbundene Aktivitätsdauer von einer im

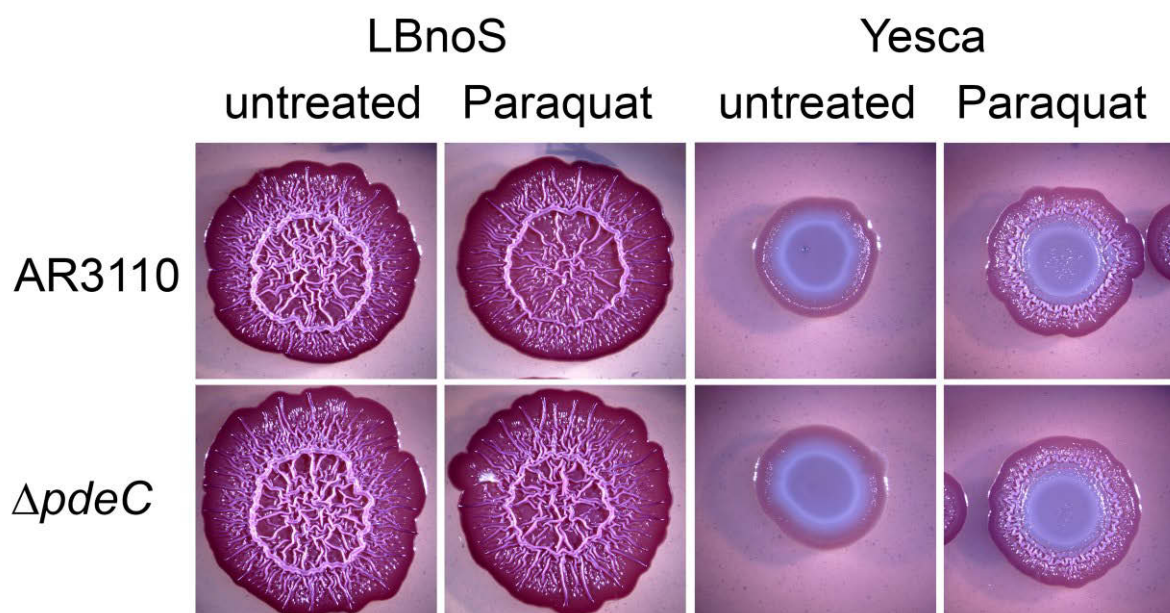
---

reduzierten Zustand aktiven CSS-PDE wie PdeC wäre ebenfalls ein variabler Parameter der Regulation. Der vielfältige Kontrollmechanismus von CSS-Domänen-PDEs und die damit verbundene Modifizierung des c-di-GMP-Spiegels trägt damit sehr wahrscheinlich zur Anpassung des Bakteriums an diverse, sich schnell ändernde Umweltbedingungen bei.

## 6 Anhang

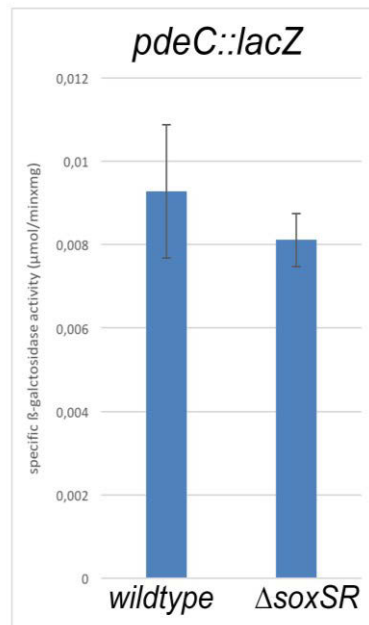


**Abb. A 1: Proteolytischer Abbau von chromosomalem PdeC in *dsbA/dsbB*-negativem Hintergrund.** Immunoblot zur Detektion von C-terminal Flag-getagtem PdeC Protein in W3110 und den entsprechenden Deletionsmutanten entlang der Wachstumskurve bei  $OD_{578nm} = 0,5; 1,5; 3; 4$  und über Nacht (on). Aufgetragen wurden pro Tasche jeweils 30  $\mu g$  Gesamtprotein, der Proteinnachweis erfolgte mit einem Flag-spezifischen Antikörper.



**Abb. A 2: Paraquat führt zu keiner veränderten Makrokoloniemorphologie in einer  $\Delta pdeC$ -Mutante.** Auf Kongorot-haltigen LBnoS- und Yesca-Platten wurden je 5  $\mu l$  einer Übernachtskultur des *E. coli* K-12 AR3110 Stammes getropft und 5 Tage bei 28°C abgedunkelt inkubiert. Die Behandlung mit Paraquat (0,5 mM) erfolgte direkt in 100  $\mu l$  der Übernachtskultur, welche dann gevortext und anschließend auf die Platten getropft wurden.





**Abb. A 3: Eine Gendeletion von  $\Delta\text{soxSR}$  hat keinen Einfluss auf die Expression der *pdeC::lacZ*-Fusion.** Expression einer *pdeC::lacZ*-Reportergenfusion in Tropfkolonien nach 22h Wachstum auf LBnoS-Platten bei 28°C.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abfalter, C. M., Schubert, M., Götz, C., Schmidt, T. P., Posselt, G. & Wessler, S. (2016).** HtrA-mediated E-cadherin cleavage is limited to DegP and DegQ homologs expressed by gram-negative pathogens. *Cell Commun Signal* **14**, 30.
- Ades, S. E. (2008).** Regulation by destruction: design of the sigmaE envelope stress response. *Curr Opin Microbiol* **11**, 535–540.
- Agirrezabala, X., Fernández, I. S., Kelley, A. C., Cartón, D. G., Ramakrishnan, V. & Valle, M. (2013).** The ribosome triggers the stringent response by RelA via a highly distorted tRNA. *EMBO Rep* **14**, 811–816.
- Alba, B. M. & Gross, C. A. (2004).** Regulation of the Escherichia coli sigma-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol* **52**, 613–619.
- Almagro-Moreno, S., Root, M. Z. & Taylor, R. K. (2015).** Role of ToxS in the proteolytic cascade of virulence regulator ToxR in Vibrio cholerae. *Mol Microbiol* **98**, 963–976.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- Amikam, D. & Galperin, M. Y. (2006).** PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**, 3–6.
- An, S. Q., Caly, D. L., McCarthy, Y., Murdoch, S. L., Ward, J., Febrer, M., Dow, J. M. & Ryan, R. P. (2014).** Novel cyclic di-GMP effectors of the YajQ protein family control bacterial virulence. *PLoS Pathog* **10**, e1004429.
- Anantharaman, V. & Aravind, L. (2000).** Cache - a signaling domain common to animal Ca(2+)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends Biochem Sci* **25**, 535–537.
- ANFINSEN, C. B. & HABER, E. (1961).** Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem* **236**, 1361–1363.
- Angerer, A., Enz, S., Ochs, M. & Braun, V. (1995).** Transcriptional regulation of ferric citrate transport in *Escherichia coli* K-12. FecI belongs to a new subfamily of sigma 70-type factors that respond to extracytoplasmic stimuli. *Mol Microbiol* **18**, 163–174.

- Anwar, N., Rouf, S. F., Romling, U. & Rhen, M. (2014).** Modulation of Biofilm-Formation in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by the Periplasmic DsbA/DsbB Oxidoreductase System Requires the GGDEF-EAL Domain Protein STM3615. *PLoS One* **9**, e106095.
- Arnosti, D. N. & Chamberlin, M. J. (1989).** Secondary sigma factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 830–834.
- Arts, I. S., Gennaris, A. & Collet, J. F. (2015).** Reducing systems protecting the bacterial cell envelope from oxidative damage. *FEBS Lett* **589**, 1559–1568.
- Bader, M. W., Xie, T., Yu, C. A. & Bardwell, J. C. (2000).** Disulfide bonds are generated by quinone reduction. *J Biol Chem* **275**, 26082–26088.
- Bai, X. C., Pan, X. J., Wang, X. J., Ye, Y. Y., Chang, L. F., Leng, D., Lei, J. & Sui, S. F. (2011).** Characterization of the structure and function of *Escherichia coli* DegQ as a representative of the DegQ-like proteases of bacterial HtrA family proteins. *Structure* **19**, 1328–1337.
- Baraquet, C. & Harwood, C. S. (2013).** Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 18478–18483.
- Bardwell, J. C., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991).** Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* **67**, 581–589.
- Barembuch, C. & Hengge, R. (2007).** Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FliA of *Escherichia coli* are controlled by FlgM-modulated proteolysis. *Mol Microbiol* **65**, 76–89.
- Barnhart, M. M. & Chapman, M. R. (2006).** Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* **60**, 131–147.
- Bayburt, T. H. & Sligar, S. G. (2010).** Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett* **584**, 1721–1727.
- BD (2006).** BD Bionutrients Technical manual. **3-2547**,
- Beloin, C., Roux, A. & Ghigo, J. M. (2008).** *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 249–289.
- Benach, J., Swaminathan, S. S., Tamayo, R., Handelman, S. K., Folta-Stogniew, E., Ramos, J. E., Forouhar, F., Neely, H., Seetharaman, J. & other authors (2007).** The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *EMBO J* **26**, 5153–5166.

- Berkmen, M. (2012).** Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **82**, 240–251.
- Bian, Z., Brauner, A., Li, Y. & Normark, S. (2000).** Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J Infect Dis* **181**, 602–612.
- Blanchard, J. L., Wholey, W. Y., Conlon, E. M. & Pomposiello, P. J. (2007).** Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. *PLoS One* **2**, e1186.
- Blanco, L. P., Evans, M. L., Smith, D. R., Badtke, M. P. & Chapman, M. R. (2012).** Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends Microbiol* **20**, 66–73.
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C. A., Ackermann, M., Kaefer, V., Sourjik, V., Roth, V. & Jenal, U. (2010).** Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* **141**, 107–116.
- Borch, J. & Hamann, T. (2009).** The nanodisc: a novel tool for membrane protein studies. *Biol Chem* **390**, 805–814.
- Botsford, J. L. & Harman, J. G. (1992).** Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* **56**, 100–122.
- Brewster, J. L., McKellar, J. L., Finn, T. J., Newman, J., Peat, T. S. & Gerth, M. L. (2016).** Structural basis for ligand recognition by a Cache chemosensory domain that mediates carboxylate sensing in *Pseudomonas syringae*. *Sci Rep* **6**, 35198.
- Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C. & Landini, P. (2006).** Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *J Bacteriol* **188**, 2027–2037.
- Brombacher, E., Dorel, C., Zehnder, A. J. & Landini, P. (2003).** The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**, 2847–2857.
- Brown, P. K., Dozois, C. M., Nickerson, C. A., Zuppardo, A., Terlonge, J. & Curtiss III, R. (2001).** MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology* **41**, 349–363.
- Browning, D. F. & Busby, S. J. (2016).** Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **14**, 638–650.

- Buchner, S., Schlundt, A., Lassak, J., Sattler, M. & Jung, K. (2015).** Structural and Functional Analysis of the Signal-Transducing Linker in the pH-Responsive One-Component System CadC of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **427**, 2548–2561.
- Calvin, N. M. & Hanawalt, P. C. (1988).** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *Journal of bacteriology* **170**, 2796–2801.
- Camilli, A. & Bassler, B. L. (2006).** Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* **311**, 1113–1116.
- Catoire, L. J., Warnet, X. L. & Warschawski, D. E. (2014).** Micelles, Bicelles, Amphipols, Nanodiscs, Liposomes, or Intact Cells: The Hitchhiker's Guide to the Study of Membrane Proteins by NMR. In *Micelles, Bicelles, Amphipols, Nanodiscs, Liposomes, or Intact Cells: The Hitchhiker's Guide to the Study of Membrane Proteins by NMR* Membrane Proteins Production for Structural Analysis, pp. 315–345. Edited by I. Mus-Veteau. New York, NY: Springer New York.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U. & Schirmer, T. (2004).** Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17084–17089.
- Chang, Z. (2016).** The function of the DegP (HtrA) protein: Protease versus chaperone. *IUBMB Life* **68**, 904–907.
- Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S. & Hultgren, S. J. (2002).** Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**, 851–855.
- Chevance, F. F. & Hughes, K. T. (2008).** Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* **6**, 455–465.
- Chiang, S. M. & Schellhorn, H. E. (2012).** Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **525**, 161–169.
- Cho, S. H. & Collet, J. F. (2013).** Many roles of the bacterial envelope reducing pathways. *Antioxid Redox Signal* **18**, 1690–1698.
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. & Jenal, U. (2005).** Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280**, 30829–30837.

- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989).** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2172–2175.
- Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R. & Ehrmann, M. (2011).** HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 152–162.
- Corpet, F. (1988).** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**, 10881–10890.
- Costerton, J. W. (1999).** Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* **11**, 217–21.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. & Marrie, T. J. (1987).** Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **41**, 435–464.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318–1322.
- Da Re, S. & Ghigo, J. M. (2006).** A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 3073–3087.
- Daley, D. O., Rapp, M., Granseth, E., Melén, K., Drew, D. & von Heijne, G. (2005).** Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science* **308**, 1321–1323.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640–6645.
- Davey, M. E. & O'toole, G. A. (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 847–867.
- Denoncin, K., Vertommen, D., Arts, I. S., Goemans, C. V., Rahuel-Clemon, S., Messens, J. & Collet, J. F. (2014).** A New Role for *Escherichia coli* DsbC in Protection Against Oxidative Stress. *J Biol Chem* **289**, 12356–12364.
- Denoncin, K., Vertommen, D., Paek, E. & Collet, J. F. (2010).** The protein-disulfide isomerase DsbC cooperates with SurA and DsbA in the assembly of the essential  $\beta$ -barrel protein LptD. *J Biol Chem* **285**, 29425–29433.
- Depas, W. H., Hufnagel, D. A., Lee, J. S., Blanco, L. P., Bernstein, H. C., Fisher, S. T., James, G. A., Stewart, P. S. & Chapman, M. R. (2013).** Iron induces bimodal population development by *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2629–2634.

- Depuydt, M., Leonard, S. E., Vertommen, D., Denoncin, K., Morsomme, P., Wahni, K., Messens, J., Carroll, K. S. & Collet, J. F. (2009).** A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science* **326**, 1109–1111.
- Donné, J., Van Kerckhoven, M., Maes, L., Cos, P. & Dewilde, S. (2016).** The role of the globin-coupled sensor YddV in a mature *E. coli* biofilm population. *Biochim Biophys Acta* **1864**, 835–839.
- Dorel, C., Lejeune, P. & Rodrigue, A. (2006).** The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities. *Res Microbiol* **157**, 306–314.
- Droge, W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47–95.
- Dunne, W. M. (2002).** Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately. *Clin Microbiol Rev* **15**, 155–166.
- Ehrmann, M. & Clausen, T. (2004).** Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu Rev Genet* **38**, 709–724.
- Eichinger, A., Haneburger, I., Koller, C., Jung, K. & Skerra, A. (2011).** Crystal structure of the sensory domain of *Escherichia coli* CadC, a member of the ToxR-like protein family. *Protein Sci* **20**, 656–669.
- Epstein, E. A. & Chapman, M. R. (2008).** Polymerizing the fibre between bacteria and host cells: the biogenesis of functional amyloid fibres. *Cell Microbiol* **10**, 1413–1420.
- Facey, S. J. & Kuhn, A. (2004).** Membrane integration of *E. coli* model membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 55–66.
- Fan, F., Liu, Z., Jabeen, N., Birdwell, L. D., Zhu, J. & Kan, B. (2014).** Enhanced interaction of *Vibrio cholerae* virulence regulators TcpP and ToxR under oxygen-limiting conditions. *Infect Immun* **82**, 1676–1682.
- Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H. R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S. R. & other authors (2008).** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **36**, D281–8.
- Flemming, H. C. & Wingender, J. (2010).** The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**, 623–633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2016).** Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**, 563–575.

- Forman, H. J. & Torres, M. (2001).** Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB Life* **51**, 365–371.
- Forst, S., Delgado, J. & Inouye, M. (1989).** Phosphorylation of OmpR by the osmosensor EnvZ modulates expression of the ompF and ompC genes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6052–6056.
- Fraser, D. & Powell, R. E. (1950).** The kinetics of trypsin digestion. *J Biol Chem* **187**, 803–820.
- Früh, V., Zhou, Y., Chen, D., Loch, C., Ab, E., Grinkova, Y. N., Verheij, H., Sligar, S. G., Bushweller, J. H. & Siegal, G. (2010).** Application of fragment-based drug discovery to membrane proteins: identification of ligands of the integral membrane enzyme DsbB. *Chem Biol* **17**, 881–891.
- G. Zuo\_, Z. Xu, & B. H. (2013).** Shigella Strains Are Not Clones of *Escherichia coli* but Sister Species in the Genus *Escherichia*. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **11**, 61–65.
- Galperin, M. Y. (2005).** A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol* **5**, 35.
- Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N. & Koonin, E. V. (2001).** Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* **203**, 11–21.
- Gerstel, U., Kolb, A. & Römling, U. (2006).** Regulatory components at the csgD promoter--additional roles for OmpR and integration host factor and role of the 5' untranslated region. *FEMS Microbiol Lett* **261**, 109–117.
- Goemans, C., Denoncin, K. & Collet, J. F. (2014).** Folding mechanisms of periplasmic proteins. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 1517–1528.
- Grabowicz, M. & Silhavy, T. J. (2017).** Envelope Stress Responses: An Interconnected Safety Net. *Trends Biochem Sci* **42**, 232–242.
- Grantcharova, N., Peters, V., Monteiro, C., Zakikhany, K. & Romling, U. (2010).** Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **192**, 456–466.
- Green, J. & Paget, M. S. (2004).** Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* **2**, 954–966.
- Grigorova, I. L., Phleger, N. J., Mutalik, V. K. & Gross, C. A. (2006).** Insights into transcriptional regulation and sigma competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5332–5337.



- Guttenplan, S. B. & Kearns, D. B. (2013).** Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 849–871.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**, 95–108.
- Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsén, A. & Normark, S. (1995).** Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **18**, 661–670.
- Hansen, G. & Hilgenfeld, R. (2013).** Architecture and regulation of HtrA-family proteins involved in protein quality control and stress response. *Cell Mol Life Sci* **70**, 761–775.
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B. L. & other authors (2006).** Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol* **2**, 2006.0007.
- Hengge, R. (2009).** Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**, 263–273.
- Hengge, R. (2010).** Cyclic-di-GMP reaches out into the bacterial RNA world. *Sci Signal* **3**, pe44.
- Hengge, R. (2016).** Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **371**,
- Hengge, R., Galperin, M. Y., Ghigo, J. M., Gomelsky, M., Green, J., Hughes, K. T., Jenal, U. & Landini, P. (2015a).** Systematic Nomenclature for GGDEF and EAL Domain-Containing Cyclic Di-GMP Turnover Proteins of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **198**, 7–11.
- Hengge, R., Gründling, A., Jenal, U., Ryan, R. & Yildiz, F. (2015b).** Bacterial signal transduction by c-di-GMP and other nucleotide second messengers. *J Bacteriol* **198**, 15–26.
- Hengge, R. (2011).** The General Stress Response in Gram-Negative Bacteria. In *Bacterial Stress Responses 2nd ed*, pp. 251–289. Edited by G. S. Regine Hengge. Washington, DC: ASM Press.
- Hengge, R. (2010).** Role of Cyclic Di-GMP in the Regulators Networks of *Escherichia coli*. In *The Second Messenger Cyclic Di-GMP*, pp. 230–252. Edited by A.J. Wolfe & K. L. Visick. Washington, DC: ASM Press.
- Henry, J. T. & Crosson, S. (2011).** Ligand binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual review of microbiology* **65**, 261.
- Hickman, J. W. & Harwood, C. S. (2008).** Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* **69**, 376–389.

- Hillion, M. & Antelmann, H. (2015).** Thiol-based redox switches in prokaryotes. *Biol Chem* **396**, 415–444.
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E. & Stanley-Wall, N. R. (2015).** Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev* **39**, 649–669.
- Huang, C. J., Wang, Z. C., Huang, H. Y., Huang, H. D. & Peng, H. L. (2013).** YjcC, a c-di-GMP Phosphodiesterase Protein, Regulates the Oxidative Stress Response and Virulence of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *PLoS One* **8**, e66740.
- Hufnagel, D. A., DePas, W. H. & Chapman, M. R. (2014).** The Disulfide Bonding System Suppresses CsgD-independent Cellulose Production in *E. coli*. *J Bacteriol* **196**, 3690–3699.
- Hung, C., Zhou, Y., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Crowley, J. R., Heuser, J., Chapman, M. R., Hadjifrangiskou, M., Henderson, J. P. & Hultgren, S. J. (2013).** *Escherichia coli* Biofilms Have an Organized and Complex Extracellular Matrix Structure. *MBio* **4**, e00645–13.
- Imlay, J. A. (2002).** How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. *Adv Microb Physiol* **46**, 111–153.
- Imlay, J. A. (2013).** The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol* **11**, 443–454.
- Inaba, K. (2009).** Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*. *J Biochem* **146**, 591–597.
- Inaba, K. & Ito, K. (2008).** Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 520–529.
- Ingmer, H. & Brøndsted, L. (2009).** Proteases in bacterial pathogenesis. *Res Microbiol* **160**, 704–710.
- Ishihama, A. (1993).** Protein-protein communication within the transcription apparatus. *J Bacteriol* **175**, 2483–2489.
- Ito, K. & Inaba, K. (2008).** The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 450–458.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M. & Nageshwar Reddy, D. (2015).** Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* **21**, 8787–8803.
- Jenal, U. & Malone, J. (2006).** Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* **40**, 385–407.

- Jenal, U., Reinders, A. & Lori, C. (2017).** Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol* **15**, 271–284.
- Jubelin, G., Vianney, A., Beloin, C., Ghigo, J. M., Lazzaroni, J. C., Lejeune, P. & Dorel, C. (2005).** CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 2038–2049.
- Jung, Y. G., Cho, Y. B., Kim, M. S., Yoo, J. S., Hong, S. H. & Roe, J. H. (2011).** Determinants of redox sensitivity in RsrA, a zinc-containing anti-sigma factor for regulating thiol oxidative stress response. *Nucleic Acids Res* **39**, 7586–7597.
- Kadokura, H. & Beckwith, J. (2009).** Detecting folding intermediates of a protein as it passes through the bacterial translocation channel. *Cell* **138**, 1164–1173.
- Kadokura, H., Tian, H., Zander, T., Bardwell, J. C. & Beckwith, J. (2004).** Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science* **303**, 534–537.
- Kahn, T. B., Fernández, J. M. & Perez-Jimenez, R. (2015).** Monitoring Oxidative Folding of a Single Protein Catalyzed by the Disulfide Oxidoreductase DsbA. *J Biol Chem* **290**, 14518–14527.
- Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M., Roembke, B. T. & Sintim, H. O. (2012).** Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem Soc Rev* **42**, 305–341.
- Kang, J. G., Paget, M. S., Seok, Y. J., Hahn, M. Y., Bae, J. B., Hahn, J. S., Kleanthous, C., Buttner, M. J. & Roe, J. H. (1999).** RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *EMBO J* **18**, 4292–4298.
- Karatan, E. & Watnick, P. (2009).** Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 310–347.
- Kikuchi, T., Mizunoe, Y., Takade, A., Naito, S. & Yoshida, S. (2005).** Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiol Immunol* **49**, 875–884.
- Kim, H. K. & Harshey, R. M. (2016).** A Diguanylate Cyclase Acts as a Cell Division Inhibitor in a Two-Step Response to Reductive and Envelope Stresses. *MBio* **7**, e00822–16.
- Kim, S. & Sauer, R. T. (2014).** Distinct regulatory mechanisms balance DegP proteolysis to maintain cellular fitness during heat stress. *Genes Dev* **28**, 902–911.

- Kolmar, H., Waller, P. R. & Sauer, R. T. (1996).** The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J Bacteriol* **178**, 5925–5929.
- Kolter, R., Siegele, D. A. & Tormo, A. (1993).** The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* **47**, 855–874.
- Korshunov, S. & Imlay, J. A. (2010).** Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **75**, 1389–1401.
- Krasteva, P. V., Giglio, K. M. & Sondermann, H. (2012).** Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Sci* **21**, 929–948.
- Krojer, T., Pangerl, K., Kurt, J., Sawa, J., Stingl, C., Mechtler, K., Huber, R., Ehrmann, M. & Clausen, T. (2008a).** Interplay of PDZ and protease domain of DegP ensures efficient elimination of misfolded proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7702–7707.
- Krojer, T., Sawa, J., Huber, R. & Clausen, T. (2010).** HtrA proteases have a conserved activation mechanism that can be triggered by distinct molecular cues. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 844–852.
- Krojer, T., Sawa, J., Schäfer, E., Saibil, H. R., Ehrmann, M. & Clausen, T. (2008b).** Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* **453**, 885–890.
- Krukonis, E. S., Yu, R. R. & Dirita, V. J. (2000).** The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol Microbiol* **38**, 67–84.
- Kullik, I., Toledano, M. B. & Tartaglia, L. A. S., G (1995).** Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation. *Journal of bacteriology* **177**, 1275–1284.
- Kurth, F., Rimmer, K., Premkumar, L., Mohanty, B., Duprez, W., Halili, M. A., Shouldice, S. R., Heras, B., Fairlie, D. P. & other authors (2013).** Comparative sequence, structure and redox analyses of *Klebsiella pneumoniae* DsbA show that anti-virulence target DsbA enzymes fall into distinct classes. *PLoS One* **8**, e80210.
- Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D. & Weiss, D. (1989).** Expression of sigma 54 (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol Rev* **53**, 367–376.
- Ladenstein, R. & Ren, B. (2006).** Protein disulfides and protein disulfide oxidoreductases in hyperthermophiles. *FEBS J* **273**, 4170–4185.

- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**, 680–685.
- Landeta, C., Blazyk, J. L., Hatahet, F., Meehan, B. M., Eser, M., Myrick, A., Bronstain, L., Minami, S., Arnold, H. & other authors (2015).** Compounds targeting disulfide bond forming enzyme DsbB of Gram-negative bacteria. *Nat Chem Biol* **11**, 292–298.
- Landeta, C., Meehan, B. M., McPartland, L., Ingendahl, L., Hatahet, F., Tran, N. Q., Boyd, D. & Beckwith, J. (2017).** Inhibition of Virulence-promoting Disulfide Bond Formation Enzyme DsbB is blocked by Mutating Residues in two distinct regions. *J Biol Chem* **292**, 6529–6541.
- Le Quéré, B. & Ghigo, J. M. (2009).** BcsQ is an essential component of the Escherichia coli cellulose biosynthesis apparatus that localizes at the bacterial cell pole. *Mol Microbiol* **72**, 724–740.
- Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W.-S., Yu, M.-H., Storz, G. & Ryu, S. E. (2004).** Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nature structural & Molecular Biology* **11**, 1179–1185.
- Leverrier, P., Declercq, J. P., Denoncin, K., Vertommen, D., Hiniker, A., Cho, S. H. & Collet, J. F. (2011).** Crystal structure of the outer membrane protein RcsF, a new substrate for the periplasmic protein-disulfide isomerase DsbC. *J Biol Chem* **286**, 16734–16742.
- Leverrier, P., Vertommen, D. & Collet, J. F. (2010).** Contribution of proteomics toward solving the fascinating mysteries of the biogenesis of the envelope of Escherichia coli. *Proteomics* **10**, 771–784.
- Liang, Z. X. (2015).** The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites. *Nat Prod Rep* **32**, 663–683.
- Lindenberg, S., Klauck, G., Pesavento, C., Klauck, E. & Hengge, R. (2013).** The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in E. coli biofilm control. *EMBO J* **32**, 2001–2014.
- Liu, K., Bittner, A. N. & Wang, J. D. (2015).** Diversity in (p)ppGpp metabolism and effectors. *Curr Opin Microbiol* **24**, 72–79.
- Lonetto, M. A., Brown, K. L., Rudd, K. E. & Buttner, M. J. (1994).** Analysis of the Streptomyces coelicolor sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7573–7577.

- López, D., Vlamakis, H. & Kolter, R. (2010).** Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000398.
- Lu, J. & Holmgren, A. (2013).** The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med* **66**, 75–78.
- Lucht, J. M., Dersch, P., Kempf, B. & Bremer, E. (1994).** Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled proU operon of Escherichia coli. *J Biol Chem* **269**, 6578–6578.
- Malet, H., Canellas, F., Sawa, J., Yan, J., Thalassinos, K., Ehrmann, M., Clausen, T. & Saibil, H. R. (2012).** Newly folded substrates inside the molecular cage of the HtrA chaperone DegQ. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 152–157.
- Malone, J. G., Jaeger, T., Spangler, C., Ritz, D., Spang, A., Arrieumerlou, C., Kaever, V., Landmann, R. & Jenal, U. (2010).** YfiBNR mediates cyclic di-GMP dependent small colony variant formation and persistence in Pseudomonas aeruginosa. *PLoS Pathog* **6**, e1000804.
- Malone, J. G., Williams, R., Christen, M., Jenal, U., Spiers, A. J. & Rainey, P. B. (2007).** The structure-function relationship of WspR, a Pseudomonas fluorescens response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology* **153**, 980–994.
- Marshall, K. E. & Serpell, L. C. (2009).** Structural integrity of beta-sheet assembly. *Biochem Soc Trans* **37**, 671–676.
- Martinez, L. C. & Vadyvaloo, V. (2014).** Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 38.
- Matsuyama, B. Y., Krasteva, P. V., Baraquet, C., Harwood, C. S., Sondermann, H. & Navarro, M. V. (2016).** Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E209–18.
- McKenney, P. T., Driks, A. & Eichenberger, P. (2013).** The Bacillus subtilis endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol* **11**, 33–44.
- Meltzer, M., Hasenbein, S., Mamant, N., Merdanovic, M., Poepsel, S., Hauske, P., Kaiser, M., Huber, R., Krojer, T. & other authors (2009).** Structure, function and regulation of the conserved serine proteases DegP and DegS of Escherichia coli. *Res Microbiol* **160**, 660–666.
- Merdanovic, M., Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R. & Ehrmann, M. (2011).** Protein quality control in the bacterial periplasm. *Annu Rev Microbiol* **65**, 149–168.

- Messens, J., Collet, J. F., Van Belle, K., Brosens, E., Loris, R. & Wyns, L. (2007).** The oxidase DsbA folds a protein with a nonconsecutive disulfide. *J Biol Chem* **282**, 31302–31307.
- Messner, K. R. & Imlay, J. A. (1999).** The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**, 10119–10128.
- Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F. & Reichheld, J. P. (2009).** Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu Rev Genet* **43**, 335–367.
- Mika, F. & Hengge, R. (2013).** Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and *Salmonella*. *Int J Mol Sci* **14**, 4560–4579.
- Mika, F. & Hengge, R. (2014).** Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. *RNA Biol* **11**, 494–507.
- Miller, J. H. (1972).** *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY.
- Miller, J. H. & Schäfer, J. (1992).** *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*, Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Miller, V. L. & Mekalanos, J. J. (1984).** Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3471–3475.
- Mills, E., Pultz, I. S., Kulasekara, H. D. & Miller, S. I. (2011).** The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiol* **13**, 1122–1129.
- Miroux, B. & Walker, J. E. (1996).** Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**, 289–298.
- Mogk, A., Schmidt, R. & Bukau, B. (2007).** The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol* **17**, 165–172.
- Morgan, J. L., McNamara, J. T. & Zimmer, J. (2014).** Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 489–496.
- Morgan, S. J., French, E. L., Thomson, J. J., Seaborn, C. P., Shively, C. A. & Krukoni, E. S. (2015).** Formation of an Intramolecular Periplasmic Disulfide Bond in TcpP Protects TcpP and TcpH from Degradation in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **198**, 498–509.
- Nakai, T., Sugano, Y., Shoda, M., Sakakibara, H., Oiwa, K., Tuzi, S., Imai, T., Sugiyama, J., Takeuchi, M. & other authors (2013).** Formation of highly twisted ribbons in a

carboxymethylcellulase gene-disrupted strain of a cellulose-producing bacterium. *J Bacteriol* **195**, 958–964.

**Natale, P., Brüser, T. & Driessen, A. J. (2008).** Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1735–1756.

**Nesper, J., Reinders, A., Glatter, T., Schmidt, A. & Jenal, U. (2012).** A novel capture compound for the identification and analysis of cyclic di-GMP binding proteins. *J Proteomics* **75**, 4874–4878.

**Newell, P. D., Monds, R. D. & O'Toole, G. A. (2009).** LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3461–3466.

**Nikolskaya, A. N., Mulkidjanian, A. Y., Beech, I. B. & Galperin, M. Y. (2003).** MASE1 and MASE2: two novel integral membrane sensory domains. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**, 11–16.

**Ogasawara, H., Yamamoto, K. & Ishihama, A. (2010).** Regulatory role of MlrA in transcription activation of *csgD*, the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **312**, 160–168.

**Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J., Mélida, H., Mazur, O., Bulone, V. & Zimmer, J. (2013).** BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 17856–17861.

**Onder, O., Turkarslan, S., Sun, D. & Daldal, F. (2008).** Overproduction or absence of the periplasmic protease DegP severely compromises bacterial growth in the absence of the dithiol: disulfide oxidoreductase DsbA. *Mol Cell Proteomics* **7**, 875–890.

**Orr, M. W., Donaldson, G. P., Severin, G. B., Wang, J., Sintim, H. O., Waters, C. M. & Lee, V. T. (2015).** Oligoribonuclease is the primary degradative enzyme for pGpG in *Pseudomonas aeruginosa* that is required for cyclic-di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E5048–57.

**Osborne, A. R., Rapoport, T. A. & van den Berg, B. (2005).** Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 529–550.

**Ottemann, K. M. & Mekalanos, J. J. (1996).** The ToxR protein of *Vibrio cholerae* forms homodimers and heterodimers. *J Bacteriol* **178**, 156–162.

**Page, M. J. & Di Cera, E. (2008).** Evolution of peptidase diversity. *J Biol Chem* **283**, 30010–30014.



- Paget, M. S., Bae, J. B., Hahn, M. Y., Li, W., Kleanthous, C., Roe, J. H. & Buttner, M. J. (2001).** Mutational analysis of RsrA, a zinc-binding anti-sigma factor with a thiol-disulphide redox switch. *Mol Microbiol* **39**, 1036–1047.
- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W. C., Blair, D. F. & Harshey, R. M. (2010).** The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell* **38**, 128–139.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehrlis, A. & Hengge, R. (2008).** Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **22**, 2434–2446.
- Pesavento, C. & Hengge, R. (2012).** The global repressor FliZ antagonizes gene expression by sigmaS-containing RNA polymerase due to overlapping DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* **40**, 4783–4793.
- Pitt-Rivers, R. & Impiombato, F. S. (1968).** The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *Biochem J* **109**, 825–830.
- Povolotsky, T. L. & Hengge, R. (2012).** 'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second messenger c-di-GMP. *J Biotechnol* **160**, 10–16.
- Povolotsky, T. L. & Hengge, R. (2015).** Genome-Based Comparison of Cyclic Di-GMP Signaling in Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* Strains. *J Bacteriol* **198**, 111–126.
- Powell, B. S., Rivas, M. P., Court, D. L., Nakamura, Y. & Turnbough, C. L. J. (1994).** Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res* **22**, 5765–5766.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P. & Dorel, C. (2001).** Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol* **183**, 7213–7223.
- Pultz, I. S., Christen, M., Kulasekara, H. D., Kennard, A., Kulasekara, B. & Miller, S. I. (2012).** The response threshold of *Salmonella* PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. *Mol Microbiol* **86**, 1424–1440.
- Quan, S., Schneider, I., Pan, J., Von Hacht, A. & Bardwell, J. C. (2007).** The CXXC motif is more than a redox rheostat. *J Biol Chem* **282**, 28823–28833.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. & Deber, C. M. (2009).** Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1760–1765.

- Reinders, A., Hee, C. S., Ozaki, S., Mazur, A., Boehm, A., Schirmer, T. & Jenal, U. (2015).** Expression and Genetic Activation of Cyclic Di-GMP-Specific Phosphodiesterases in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **198**, 448–462.
- Ren, G., Champion, M. M. & Huntley, J. F. (2014).** Identification of disulfide bond isomerase substrates reveals bacterial virulence factors. *Mol Microbiol* **94**, 926–944.
- Richter, A. M., Povolotsky, T. L., Wieler, L. H. & Hengge, R. (2014).** Cyclic-di-GMP signalling and biofilm-related properties of the Shiga toxin-producing 2011 German outbreak *Escherichia coli* O104:H4. *EMBO Mol Med* **6**, 1622–1637.
- Rietsch, A., Belin, D., Martin, N. & Beckwith, J. (1996).** An in vivo pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13048–13053.
- Rietsch, A., Bessette, P., Georgiou, G. & Beckwith, J. (1997).** Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J Bacteriol* **179**, 6602–6608.
- Ritchie, T. K., Grinkova, Y. V., Bayburt, T. H., Denisov, I. G., Zolnerciks, J. K., Atkins, W. M. & Sligar, S. G. (2009).** Chapter 11 - Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. *Methods Enzymol* **464**, 211–231.
- Römling, U. (2005).** Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1234–1246.
- Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D. & Normark, S. (1998).** Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol* **180**, 722–731.
- Römling, U. & Galperin, M. Y. (2015).** Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol* **23**, 545–557.
- Römling, U., Galperin, M. Y. & Gomelsky, M. (2013).** Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**, 1–52.
- Russel, M. & Model, P. (1982).** Filamentous phage pre-coat is an integral membrane protein: analysis by a new method of membrane preparation. *Cell* **28**, 177–184.
- Ryjenkov, D. A., Simm, R., Römling, U. & Gomelsky, M. (2006).** The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* **281**, 30310–30314.
- Ryjenkov, D. A., Tarutina, M., Moskvina, O. V. & Gomelsky, M. (2005).** Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol* **187**, 1792–1798.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual.*, Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sarenko, O., Klauck, G., Wilke, F. M., Pfiffer, V., Richter, A. M., Herbst, S., Kaeffer, V. & Hengge, R. (2017).** More than Enzymes That Make or Break Cyclic Di-GMP-Local Signaling in the Interactome of GGDEF/EAL Domain Proteins of *Escherichia coli*. *MBio* **8**, e01639–17.
- Sawa, J., Malet, H., Krojer, T., Canellas, F., Ehrmann, M. & Clausen, T. (2011).** Molecular adaptation of the DegQ protease to exert protein quality control in the bacterial cell envelope. *J Biol Chem* **286**, 30680–30690.
- Schaap, P. (2013).** Cyclic di-nucleotide signaling enters the eukaryote domain. *IUBMB Life* **65**, 897–903.
- Schlundt, A., Buchner, S., Janowski, R., Heydenreich, T., Heemann, R., Lassak, J., Geerlof, A., Stehle, R., Niessing, D. & other authors (2017).** Structure-function analysis of the DNA-binding domain of a transmembrane transcriptional activator. *Sci Rep* **7**, 1051.
- Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A. & Gomelsky, M. (2005).** The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol* **187**, 4774–4781.
- Schneider, J. S. & Glickman, M. S. (2013).** Function of site-2 proteases in bacteria and bacterial pathogens. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 2808–2814.
- Scoffone, E., Jori, G. & Galiazzo, G. (1970).** Selective photo-oxidation of amino acids in proteins. *Biochem J* **117**, 53P.
- Serra, D. O. & Hengge, R. (2014).** Stress responses go three dimensional - the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environ Microbiol* **16**, 1455–1471.
- Serra, D. O., Klauck, G. & Hengge, R. (2015).** Vertical stratification of matrix production is essential for physical integrity and architecture of macrocolony biofilms of *Escherichia coli*. *Environ Microbiol*
- Serra, D. O., Richter, A. M. & Hengge, R. (2013a).** Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms. *J Bacteriol* **195**, 5540–5554.
- Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F. & Hengge, R. (2013b).** Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio* **4**, e00103–13.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D'Ari, R. (2007).** *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* **189**, 8746–8749.

- Shapiro, J. A. (1987).** Organization of developing *Escherichia coli* colonies viewed by scanning electron microscopy. *J Bacteriol* **169**, 142–156.
- Shimizu, T. (2013).** The Heme-Based Oxygen-Sensor Phosphodiesterase Ec DOS (DosP): Structure-Function Relationships. *Biosensors (Basel)* **3**, 211–237.
- Simm, R., Ahmad, I., Rhen, M., Le Guyon, S. & Römling, U. (2014).** Regulation of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Future Microbiol* **9**, 1261–1282.
- Simm, R., Lusch, A., Kader, A., Andersson, M. & Römling, U. (2007).** Role of EAL-containing proteins in multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **189**, 3613–3623.
- Simons, R. W., Houman, F. & Kleckner, N. (1987).** Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**, 85–96.
- Skorko-Glonek, J., Sobiecka-Szkatula, A., Narkiewicz, J. & Lipinska, B. (2008).** The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperatures. *Microbiology* **154**, 3649–3658.
- Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N. & Hengge, R. (2009).** Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology* **155**, 1318–1331.
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A. & Bertin, P. (1999).** Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J Bacteriol* **181**, 7500–7508.
- Spiess, C., Beil, A. & Ehrmann, M. (1999).** A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**, 339–347.
- Spurbeck, R. R., Tarrien, R. J. & Mobley, H. L. (2012).** Enzymatically Active and Inactive Phosphodiesterases and Diguanylate Cyclases Are Involved in Regulation of Motility or Sessility in *Escherichia coli* CFT073. *MBio* **3**,
- Srivatsan, A. & Wang, J. D. (2008).** Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr Opin Microbiol* **11**, 100–105.
- Storz, G., Tartaglia, L. A. & Ames, B. N. (1990).** The *oxyR* regulon. *Antonie Van Leeuwenhoek* **58**, 157–161.
- Ströher, E. & Dietz, K. J. (2006).** Concepts and approaches towards understanding the cellular redox proteome. *Plant Biol (Stuttg)* **8**, 407–418.

- Su, H. P., Lin, D. Y. & Garboczi, D. N. (2006).** The structure of G4, the poxvirus disulfide oxidoreductase essential for virus maturation and infectivity. *J Virol* **80**, 7706–7713.
- Sundriyal, A., Massa, C., Samoray, D., Zehender, F., Sharpe, T., Jenal, U. & Schirmer, T. (2014).** Inherent regulation of EAL domain-catalyzed hydrolysis of second messenger cyclic di-GMP. *J Biol Chem* **289**, 6978–6990.
- Sutherland, I. W. (2001).** The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* **9**, 222–227.
- Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S. R. & Romeo, T. (2006).** Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev* **20**, 2605–2617.
- Tagliabue, L., Maciag, A., Antoniani, D. & Landini, P. (2010).** The yddV-dos operon controls biofilm formation through the regulation of genes encoding curli fibers' subunits in aerobically growing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**, 477–484.
- Takahashi, H., Sekimoto, M., Tanaka, M., Tanaka, A., Igarashi, J. & Shimizu, T. (2012).** Hydrogen sulfide stimulates the catalytic activity of a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli* (Ec DOS). *J Inorg Biochem* **109**, 66–71.
- Tarutina, M., Ryjenkov, D. A. & Gomelsky, M. (2006).** An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* **281**, 34751–34758.
- Teoh, W. P., Matson, J. S. & DiRita, V. J. (2015).** Regulated intramembrane proteolysis of the virulence activator TcpP in *Vibrio cholerae* is initiated by the tail-specific protease (Tsp). *Mol Microbiol* **97**, 822–831.
- Tetsch, L. & Jung, K. (2009).** The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. *Mol Microbiol* **73**, 982–991.
- Tetsch, L., Koller, C., Donhofer, A. & Jung, K. (2011).** Detection and function of an intramolecular disulfide bond in the pH-responsive CadC of *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* **11**, 74.
- Toledano, M. B., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P. T., Schneider, T. D. & Storz, G. (1994).** Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell* **78**, 897–909.
- Touati, D. (2000a).** Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli*--how many ways are there to trigger soxRS response. *Redox Rep* **5**, 287–293.
- Touati, D. (2000b).** Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **373**, 1–6.

- Tschowri, N. (2016).** Cyclic Dinucleotide-Controlled Regulatory Pathways in *Streptomyces* Species. *J Bacteriol* **198**, 47–54.
- Tschowri, N., Busse, S. & Hengge, R. (2009).** The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes Dev* **23**, 522–534.
- Tuckerman, J. R., Gonzalez, G. & Gilles-Gonzalez, M. A. (2011).** Cyclic di-GMP activation of polynucleotide phosphorylase signal-dependent RNA processing. *J Mol Biol* **407**, 633–639.
- Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Sousa, E. H., Wan, X., Saito, J. A., Alam, M. & Gilles-Gonzalez, M. A. (2009).** An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry* **48**, 9764–9774.
- Uden, G. & Bongaerts, J. (1997).** Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* **1320**, 217–234.
- Upadhyay, A. A., Fleetwood, A. D., Adebali, O., Finn, R. D. & Zhulin, I. B. (2016).** Cache Domains That are Homologous to, but Different from PAS Domains Comprise the Largest Superfamily of Extracellular Sensors in Prokaryotes. *PLoS Comput Biol* **12**, e1004862.
- Römling, U. (2007).** Cellulose biosynthesis in enterobacteriaceae. In *Molecular and Structural Biology*, pp. 107–122. Edited by J. A. I. M. S. R.M. Brown. Stockholm: Springer.
- Vertommen, D., Depuydt, M., Pan, J., Leverrier, P., Knoop, L., Szikora, J. P., Messens, J., Bardwell, J. C. & Collet, J. F. (2008).** The disulphide isomerase DsbC cooperates with the oxidase DsbA in a DsbD-independent manner. *Mol Microbiol* **67**, 336–349.
- Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M. & Lejeune, P. (1998).** Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J Bacteriol* **180**, 2442–2449.
- Wada, T., Hatamoto, Y. & Kutsukake, K. (2012).** Functional and expressional analyses of the anti-FlhD4C2 factor gene ydiV in *Escherichia coli*. *Microbiology* **158**, 1533–1542.
- Wang, S., Fleming, R. T., Westbrook, E. M., Matsumura, P. & McKay, D. B. (2006).** Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. *J Mol Biol* **355**, 798–808.
- Wang, X., Smith, D. R., Jones, J. W. & Chapman, M. R. (2007).** In vitro polymerization of a functional *Escherichia coli* amyloid protein. *J Biol Chem* **282**, 3713–3719.
- Watnick, P. & Kolter, R. (2000).** Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**, 2675–2679.

- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G. & Hengge, R. (2006).** Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**, 1014–1034.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F. & Hengge, R. (2005).** Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* **187**, 1591–1603.
- Whitney, J. C. & Howell, P. L. (2013).** Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol* **21**, 63–72.
- Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1993).** Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*. *Protein Sci* **2**, 717–726.
- Yang, M., Liu, Z., Hughes, C., Stern, A. M., Wang, H., Zhong, Z., Kan, B., Fenical, W. & Zhu, J. (2013).** Bile salt-induced intermolecular disulfide bond formation activates *Vibrio cholerae* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2348–2353.
- Yura, T. & Nakahigashi, K. (1999).** Regulation of the heat-shock response. *Curr Opin Microbiol* **2**, 153–158.
- Zheng, M., Åslund, F. & Storz, G. (1998).** Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**, 1718–1722.
- Zheng, M., Wang, X., Doan, B., Lewis, K. A. & Storz, G. (2001).** Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **183**, 4571–4579.
- Zheng, Y., Sambou, T., Bogomolnaya, L. M., Cirillo, J. D., McClelland, M. & Andrews-Polymenis, H. (2013).** The EAL domain containing protein STM2215 (rtn) is needed during *Salmonella* infection and has cyclic di-GMP phosphodiesterase activity. *Mol Microbiol* **89**, 403–419.
- Zhulin, I. B., Nikolskaya, A. N. & Galperin, M. Y. (2003).** Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *J Bacteriol* **185**, 285–294.
- Ziegelhoffer, E. C. & Donohue, T. J. (2009).** Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nat Rev Microbiol* **7**, 856–863.
- Zobell, C. E. (1943).** The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol* **46**, 39–56.

---

**Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. & Römling, U. (2001).** The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**, 1452–1463.



## **8 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe.

Ich habe mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad beworben und besitze auch keinen entsprechenden Doktorgrad. Die Dissertation oder Teile davon wurden nicht in anderen wissenschaftlichen Einrichtungen eingereicht, abgelehnt oder angenommen.

Ich nehme die dem Verfahren zugrund liegende Promotionsordnung zur Kenntnis und erkläre die Grundsätze der Humboldt-Universität zu Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten zu haben.

Datum/Unterschrift